Aus der Neurologischen Universitätsklinik und Poliklinik
Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Georg Mertens

Laser-Nephelometrie: Versuche und Erfahrungen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von
Jürgen Schmitt
aus Bamberg

Würzburg, den 19. Mai 1982

Aus der Neurologischen Universitätsklinik und Poliklinik
Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Georg Mertens

Laser-Nephelometrie: Versuche und Erfahrungen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von
Jürgen Schmitt
aus Bamberg

Würzburg, den 19. Mai 1982

Referent: Prof. Dr. med. H. G. Mertens
Korreferent: Prof. Dr. med. D. Dommasch
Dekan: Prof. Dr. med. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung 3
1.1. Nephelometrie 3
1.2. Laser 4
1.3. Besondere Probleme der Nephelometrie im Lichte der Literatur 5
1.4. Bestimmung der Immunglobuline im Liquor cerebrospinalis 7
1.5. Die übliche Meßmethode und ihre Probleme 8
1.6. Kurze Übersicht der dargestellten Probleme 10
2. Hauptteil 11
2.1. Materialien für die Versuche 11
2.1.1. Geräte 11
2.1.2. Reagenzien 11
2.1.3. Lösungen 12
2.2. Grundschema der Versuche mit dem IgA-Anti-IgA-System . 12
2.3. Versuche zur Verbesserung der Bestimmung der Immunglobuline im Liquor 13
2.3.1. Variation der Antiserumkonzentration 13
2.3.2. Einfluß der Inkubationszeit 13
2.3.3. Zusatz von Protamin als Streulicht-verstärkende Substanz 15
2.3.3.1. Versuche mit physiologischer Kochsalzlösung als Inkubationsmedium 17
2.3.3.2. Versuche mit Aqua bidest. als Inkubationsmedium .. 18
2.3.3.3. Durch Protaminzusatz optimierter Ansatz zur Bestimmung von IgA im Liquor 18
2.3.3.4. Durch Protaminzusatz optimierter Ansatz zur Bestimmung von IgM im Liquor 20
2.4. Versuche zur Laser-nephelometrischen Bestimmung des Äquivalenzpunktes 22
2.4.1. Verschiebung des Äquivalenzpunktes bei IgM-Antiseren mit unterschiedlichen Antikörpertitern 22
2.4.2. Versuche zur Bestimmung von Insulin-Antikörpern 24
2.4.3. Versuche mit kreuzreagierenden Substanzen 24
2.5. Versuche zur LN-Immunoassay im trüben Medium 28
2.6. Zur Resuspension bei Langzeitinkubation 34

2.7. Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Literatur 35
2.7.1. Möglichkeiten zur Verbesserung der Methode zur Bestimmung von IgA und IgM im Liquor 35
2.7.2. Der Äquivalenzpunkt auf der LN Immuntrübungskurve . 37
2.7.2.1. Die Abhängigkeit seiner Lage von verschiedenen Faktoren 37
2.7.2.2. Bestimmung von unbekannten Antikörperkonzentrationen mittels Äquivalenzpunktbestimmung 39
2.7.2.3. Der Einfluß von Kreuzreaktionen 41
2.7.3. Die Messung im trüben Medium 43
2.7.3.1. Einfluß Streulicht-verstärkender und Streulicht--vermindernder Substanzen 43
2.7.3.2. Möglichkeiten bei trüben Medien 45
3. Zusammenfassung 48
4. Literaturverzeichnis 50

1. EINLEITUNG

Immunologische Methoden zur Bestimmung von Serum- und Liquoreiweißen sind u.a. die radiale Immundiffusion, die Elektroimmunoassay, die Radioimmunoassay oder die Enzymimmunoassay. Alle haben ihre Vor- und Nachteile. Diese Arbeit untersucht eine Meßmethode für Immunreaktionen, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat: die Laser-Nephelometrie. Im folgenden sollen nun zunächst die Begriffe Nephelometrie und Laser erläutert werden.

1.1. Nephelometrie

Will man die Trübung einer Flüssigkeit messen, so gibt es dafür zwei Grundprinzipien: Bei beiden schickt man einen Lichtstrahl bekannter Intensität durch die Flüssigkeit. Nun kann man die Restintensität des zentralen Lichtstrahls messen und aus ihr auf die Trübung schließen; diese Methode nennt man Turbidimetrie (Abb.1). Oder man mißt das gestreute Licht, d.h. die Lichtintensität unter einem gewissen vom Zentralstrahl abweichenden Winkel. Das ist die Nephelometrie oder Tyndallometrie (Abb.1).

Gibt man Antigen und Antikörper in einer Flüssigkeit zusammen, so wird bei entsprechender Molekülgröße und Konzentration der beiden Reaktanden aus einer kaum getrübten Flüssigkeit nach einer gewissen Inkubationszeit eine stark getrübte Flüssigkeit. Dieses Phänomen ist mit der Nephelometrie meßbar.

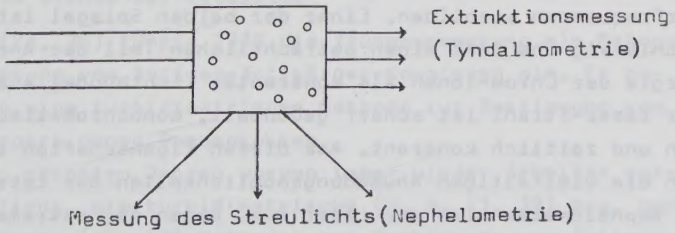

Abb.1 : Möglichkeiten zur Bestimmung der Trübung einer Flüssigkeit

1.2. Laser

Das Wort Laser ist eine Abkürzung für Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Lichtverstärkung durch erzwungene Emission von Strahlung).

Am Beispiel des Rubin-Lasers, eines Festkörper-Lasers, soll das Prinzip dargestellt werden. Bei einem Festkörper-Laser sind in das Kristallgitter eines unbeteiligten Grundmaterials (Al_2O_3) die maßgeblichen Fremdatome (Chrom-Ionen) eingebaut.

Durch die Einstrahlung von Licht werden die Chrom-Ionen angeregt, d.h. auf ein höheres Energieniveau "gepumpt". Einige von ihnen gehen durch Ausstrahlung ihrer Anregungsenergie in Form von Lichtquanten wieder in den ursprünglichen Zustand, das untere Energieniveau,über. Wenn die abgegebenen Lichtquanten auf angeregte Chrom-Ionen treffen, veranlassen sie diese ihre Anregungsenergie auszustrahlen (erzwungene Emission), dabei nimmt die Strahlung lawinenartig zu. Treffen sie auf ein Chrom-Ion im unteren Energieniveau, so kommt es zu einer "induzierten Absorption", d.h. einer Abschwächung der Strahlung. Werden in einem laseraktiven Material mehr Atome in das obere Energieniveau gepumpt, als sich im unteren befinden (Inversion der Besetzungszahlen), kommt es zu mehr Emissions- als Absorptionsakten, d.h. eingestrahltes Licht wird verstärkt.

Von den verspiegelten Stirnflächen des Rubin-Stabs werden die Lichtquanten reflektiert, so daß eine stehende Lichtwelle entsteht. Die beiden Spiegelflächen bilden also einen optischen Resonator, in dem sich, wie in jedem Resonator, nur die Resonanzfrequenzen ausbilden. Einer der beiden Spiegel ist teildurchlässig und läßt einen beträchtlichen Teil der Anregungsenergie der Chrom-Ionen als kohärentes Lichtbündel austreten.

Der Laser-Strahl ist scharf gebündelt, monochromatisch, räumlich und zeitlich kohärent. Aus diesen Eigenschaften ergeben sich die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Lasers.

Im Nephelometer wird der Laser v.a. wegen der extremen räumlichen Konzentration seiner Strahlen und der großen Exaktheit und Intensität seiner Strahlung eingesetzt (36) und den früher - und z.T. auch heute noch - benutzten Xenonlampen (z.B. 21) vorgezogen.

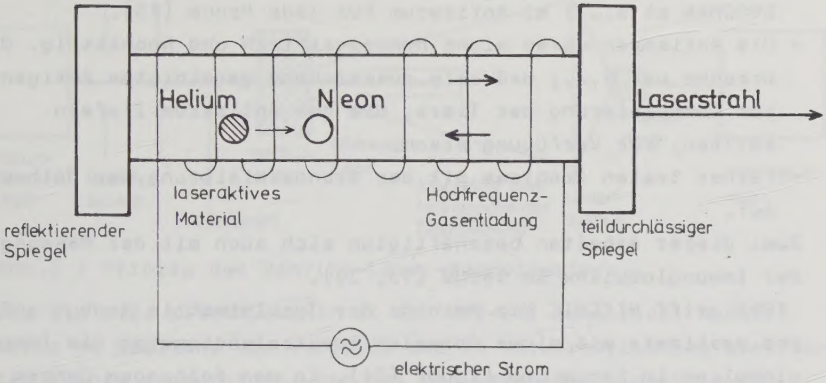

Abb.2 : Schema eines Helium-Neon-Lasers
In Gas-Lasern wird das "Pumpen" durch eine spezielle Gasentladung bewirkt. Das Helium nimmt relativ leicht eine bestimmte Anregungsenergie durch Elektronenstoß auf. Diese überträgt es auf das Neon, das in einen metastabilen Zustand - ähnlich dem der angeregten Chrom-Ionen im Rubin-Laser - übergeht. Von den Neon-Atomen werden dann die Lichtquanten durch erzwungene Emission ausgesendet. Sie werden zwischen den beiden Spiegeln hin und her gejagt. Durch den teildurchlässigen Spiegel tritt der Laser-Strahl aus.

1.3. Besondere Probleme der Nephelometrie im Lichte der Literatur

LIBBY (24, 25) führte 1938 die Trübungsmessung als Methode zur Messung von Antigen-Antikörper-Komplexen ein. Er beschrieb eine turbidimetrische Methode zur Bestimmung von Antikörpern gegen Pneumokokken.

In den nächsten Jahren wurden immer wieder Arbeiten veröffentlicht, die turbidimetrische (3, 8, 13, 39) bzw. nephelometrische (12, 13) Methoden zur Bestimmung von Antigen-Antikörper-Komplexen verwendeten. Keiner dieser Methoden gelang es, zu einer Routinemethode zu werden. Alle Autoren berichten von ähnlichen Problemen:

- Sie haben einen hohen Bedarf an Antiserum, z.B. brauchen GOODMAN et al. 1 ml Antiserum für jede Probe (13).
- Die Antiseren waren nicht hochspezifisch und hochtitrig. Die Ursache war v.a., daß kein ausreichend gereinigtes Antigen zur Immunisierung der Tiere, die das Antiserum liefern sollten, zur Verfügung stand.
- Ferner traten Probleme mit der Standardisierung der Methoden auf.

Zwei dieser Arbeiten beschäftigten sich auch mit der Messung der Immunglobuline im Serum (13, 39).

1967 griff RITCHIE die Methode der Turbidimetrie erneut auf und bestimmte mit einem normalen Spektralphotometer die Immunglobuline in Serum und Liquor (31). In den folgenden Jahren wurden für zahlreiche Serumproteine automatisierte nephelometrische Meßmethoden erarbeitet (1, 11, 18, 19, 23, 27, 33, 42 u.a.). Diese beziehen sich auf einen Autoanalyzer von Technicon, der mit einem Fluorometer als Nephelometer ausgestattet ist. Da bei den automatisierten Methoden umständliche Umstellarbeiten immer dann nötig wurden, wenn man z.B. statt IgG IgA mit dem gleichen Gerät messen wollte, wurden auch manuelle Bestimmungsmethoden entwickelt (20, 33).

Bei der Nephelometrie ist es wichtig, unter welchem Winkel zum Zentralstrahl das gestreute Licht gemessen wird. DEBYE (10) erklärte bereits 1943 in einer theoretischen Arbeit, warum eine Trübungsmessung von größeren Partikeln - wie es die Immunkomplexe von IgG und Anti-IgG sind - unter einem möglichst kleinen Winkel zum Zentralstrahl besser ist als die Messung unter einem Winkel von 90^{o} zum Zentralstrahl. Die erste Methode wird im angloamerikanischen Schrifttum als "forward light scattering" bezeichnet, zu Deutsch " das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht" (35). GITLIN et al. kamen 1950 bei einer empirischen Arbeit zum gleichen Ergebnis. Trotzdem war es noch lange Zeit üblich, die Streulichtintensität unter einem Winkel von 90^{o} zu messen. Auch bei den oben erwähnten Autoanalyzermethoden ist dies der Fall.

Durch die Verwendung eines Lasers als Lichtquelle ist es möglich, den Zentralstrahl gut auszublenden, da er schärfer gebündelt ist als bei anderen Lichtquellen, z.B. einer Xenonlampe,

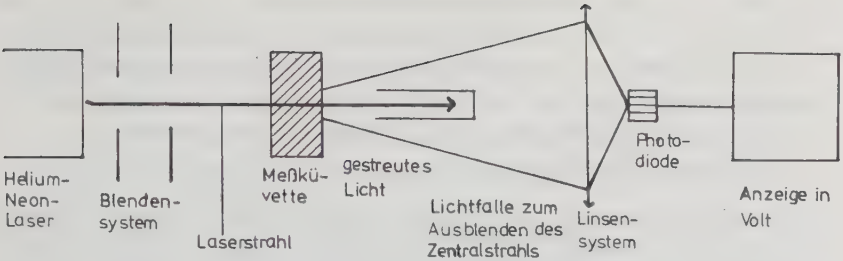

Abb.3 : Prinzip des Behring-Laser-Nephelometers

wie sie z.B. KILLINGSWORTH et al. (18-21) benutzten. Dadurch wurde es möglich, die Vorteile des in Vorwärtsrichtung gestreuten Lichts auszunutzen, was bei den Laser-Nephelometern von den Behringwerken (35, 36, Abb.3) und von Hyland (9) geschehen ist. Zuvor hatte bereits BUFFONE (4-6) den Helium-Neon-Laser bei einer "forward light scattering"-Methode in einem Zentrifugal-Analysator zur Bestimmung von Immunglobulinen angewendet.

Auch die anderen Probleme, auf die oben hingewiesen wurde, sind heute weitgehend gelöst:

- Hochspezifische, hochtitrige Antiseren können heute käuflich erworben werden (s.h.).
- Die Methoden brauchen viel weniger Antiserum z.B. 0,02 ml je Probe bei SIEBER (37).
- Es gibt einen internationalen Standard für IgG, IgA und IgM (32).

1.4. Bestimmung der Immunglobuline im Liquor cerebrospinalis

KABAT et al. (17) bestimmten 1948 die Gamma-Globuline im unkonzentrierten Liquor durch Bestimmung des Stickstoff-Gehaltes des Immunpräzipitates. RITCHIE wandte 1967 die Turbidimetrie zur Bestimmung des Immunglobulin-Gehaltes im Liquor an. SAVORY et al. (33) beschrieben 1972 eine automatisierte und eine manuelle Methode zur Bestimmung von IgG, IgA und IgM im Liquor. Sie baut auf der von KILLINGSWORTH und SAVORY angegebenen Immunglobulin-Bestimmungsmethode für Serum (19) auf, bei der der Technicon Autoanalyzer benutzt wird. Im gleichen Jahr beschäftigten sich auch MARKOWITZ et al. (27) mit einer Autoanalyzer-

Methode für die Immunglobuline im Liquor.

Der Einsatz eines Laser-Nephelometers zum gleichen Zweck wurde von einigen Autoren beschrieben, sowohl das Behring-Laser-Nephelometer (7, 15, 29, 30, 35, 36, 37, 38) als auch das Hyland-Laser-Nephelometer (z.B. 9) wurden dazu benutzt.

1.5. Die übliche Meßmethode und ihre Probleme

Die Meßverfahren beruhen darauf, daß man die Trübung der Antigen-Antikörper-Mischung mißt und daraus mittels einer Standard-Serum-Verdünnungskurve als Eichkurve die Konzentration des Antigens bestimmt. Die Reaktion von Antigen und Antikörper läßt sich als Laser-nephelometrische Immunpräzipitationskurve darstellen (Abb.4).

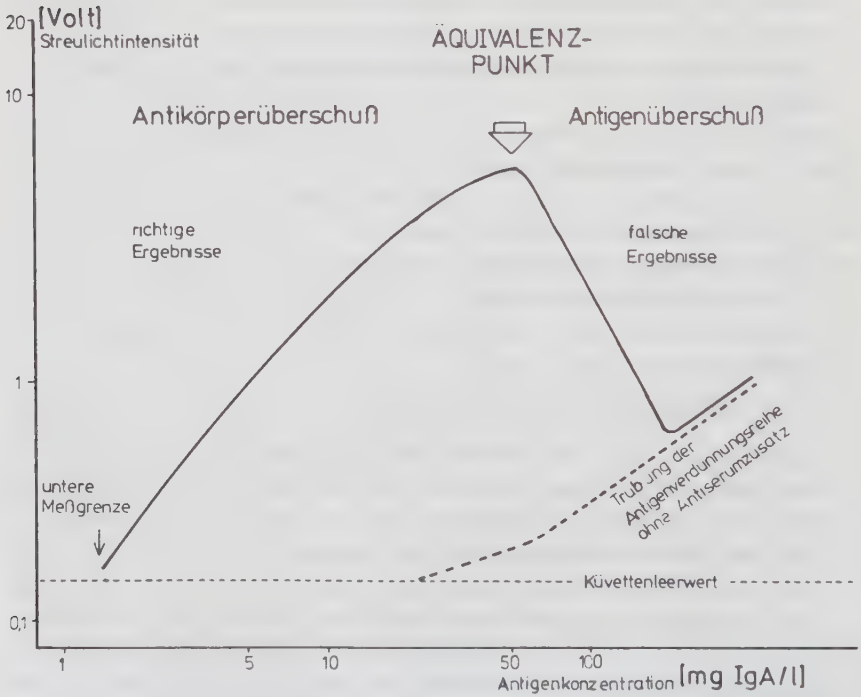

Abb.4 (Legende s. S.9)

Abb.4 : Laser-nephelometrische Immuntrübungskurve für IgA nach zweistündiger Inkubationszeit

Die Streulichtintensität und die Antigenkonzentration sind logarithmisch aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Streulichtintensität in Volt aufgetragen, die die Trübung durch die Antigen-Antikörper-Komplexe repräsentiert, auf der Abszisse die Antigen-Konzentration.

Man muß das Antigen/Antikörper-Verhältnis so wählen, daß ein relativer Überschuß an Antikörpern besteht, und man im ansteigenden Kurventeil, im Antikörperüberschuß-Bereich, liegt.

Die höchste Streulichtintensität ergibt sich am Äquivalenzpunkt. Hier herrscht ein optimales Verhältnis zwischen der Menge an Antigen und der Menge an Antikörpern. Danach fällt die Kurve steil ab, da Überschuß an Antigen zu einer Störung des dynamischen Gleichgewichts der Reaktanden führt und sich daher die Antigen-Antikörper-Komplexe wieder auflösen. Der darauf folgende Wiederanstieg der Immunpräzipitationskurve beruht auf der Eigentrübung des LN-Standard-Serum, das das Antigen - hier IgA - enthält.

Bei diesem Meßverfahren müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Das Antigen/Antikörper-Verhältnis muß so gewählt sein, daß ein relativer Überschuß an Antikörpern im Inkubationsgemisch herrscht. Man könnte sonst einen falsch zu niedrigen Wert angeben, wenn man im Antigenüberschuß-Bereich arbeitet (vgl. Abb.4). In den Antigenüberschuß-Bereich könnte man z.B. bei Paraproteinämien kommen. Man kann dies u.a. dadurch feststellen, daß man zusätzliche Antiserumverdünnung zugibt, und der Meßwert dabei steigt, da die zugegebenen Antikörper mit dem überschüssigen Antigen reagieren können (36).
- Da man den absoluten Trübungsmeßwert mit der Antigen-Konzentration korreliert, müssen die Leerwerte der Reaktionslösungen, die die Antigene bzw. die Antikörper enthalten, und aller sonstiger Beigaben zum Inkubationsgemisch sehr gering sein. Ein einfaches Abziehen des Leerwertes führt nämlich zu falschen Ergebnissen, wie die vorliegende Arbeit zeigen wird, und wie es auch von SIEBER (37) diskutiert wurde.

Auf etwas Grundlegendes sei an dieser Stelle noch hingewiesen: Fast alle neueren Methoden bringen Serum in einer so hohen Verdünnung in den Inkubationsansatz, daß die Konzentration der zu bestimmenden Substanz im Serum etwa ihrer Konzentration im unverdünnten Liquor entspricht. Daher wird in der Nephelometrie statt "Standard-Liquor" vereinfachend ca. 1:50 bis 1:100 verdünntes Standard-Serum verwendet. Darum bin ich auch im Abschnitt 1.3. auf die zahlreichen nephelometrischen Bestimmungsmethoden für Plasmaproteine im Serum eingegangen, und deswegen wird eine LN-Standard-Serum-Verdünnungsreihe für die Eichkurve der Liquorbestimmungen verwendet.

1.6. Kurze Übersicht der dargestellten Probleme

In dieser Arbeit wird auf Probleme, die bei der Laser-Nephelometrie auftraten, eingegangen:

- Alle zu messenden Flüssigkeiten müssen aus den oben genannten Gründen möglichst klar sein. Es wird über die Möglichkeiten und Schwierigkeiten der Messung in trüben Medien berichtet werden.
- Wir haben die Meßmethoden für IgA und IgM im Liquor verbessert, die bisher durch einen relativ hohen Antiserum-Verbrauch und ungenügende Empfindlichkeit gekennzeichnet waren.
- Am Rande beschäftigte uns die Bestimmung von kreuzreagierenden Substanzen mittels Laser-Nephelometrie.

2.HAUPTTEIL

2.1. Materialien für die Versuche

2.1.1. Geräte

- Als Nephelometer wurde das Laser-Nephelometer der Behringwerke (Marburg/Lahn) verwendet. Als Lichtquelle dient ihm ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm.
- Die Verdünnungen wurden mit Eppendorf-Pipetten (10 µl, 100 µl, 500 µl, 1000 µl) und Glas-Pipetten (5 ml, 10 ml) hergestellt.
- Die Reaktionen und Messungen erfolgten in Halb-Micro-Einwegküvetten für die Laser-Nephelometrie der Firma Sarstedt (Nümbrecht) mit 10 mm Lichtweg.
- Zum Aufschütteln der Küvetten nach Langzeitinkubationen wurde ein Rotormixer benutzt.

2.1.2. Reagenzien

- Antiseren:

Es wurden spezifische LN Antiseren vom Kaninchen zur Laser-Nephelometrie (Behringwerke) verwendet:

LN Antiserum gegen Human-IgG (γ-Kette)
Solltiter: 20,7 IU/ml (1,8 g/l) ± 30%

LN Antiserum gegen Human-IgA (α-Kette)
Solltiter: 89 IU/ml (1,5 g/l) ± 30%

LN Antiserum gegen Human-IgM (μ-Kette)
Solltiter: 518 IU/ml (4,5 g/l) ± 30%

LN Antiserum gegen Human-Albumin
Solltiter: 1,1 g/l ± 30%

- Antigenträger:

Die folgenden Antigene: IgG, IgA, IgM oder Albumin wurden gemessen in:

LN-Protein-Standard-Serum (Behringwerke)

Liquores von Patienten der Neurologischen Universitätsklinik, Würzburg

Mammazystenpunktat von Patienten der Universitätsfrauenklinik, Würzburg

lyophilisiertes Rinderalbumin

reines IgG, IgA und IgM für Versuche mit dem Laser-Nephelo-

meter (Behringwerke)

- Protamin

Als streulichtverstärkende Substanz wurde Protamin 1000 Roche (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach) erprobt.

2.1.3. Lösungen

Mit den folgenden Flüssigkeiten wurden Antiseren, Standard-Seren usw. verdünnt:

- physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl)
- Aqua bidest.
- Phosphatpuffer (50 mM/l, pH = 7,5):
  - 7,8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
  - 0,75 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
  - 0,5 g/l Natriumazid
  - 5,0 g/l Rinderalbumin

Dieser Puffer ist bei +4°C acht Tage haltbar.

2.2. Grundschema der Versuche mit dem IgA-Anti-IgA-System

Bei unseren Versuchen beschäftigten wir uns hauptsächlich mit dem IgA-Anti-IgA-System als Modell. Das Grundschema dafür sieht folgendermaßen aus:

Man inkubiert in einer Halb-Micro-Küvette:

0,1 ml Standard-Serum-Verdünnung, die aus dem LN Protein-Standard-Serum und physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsreihe hergestellt wird.

0,1 ml Antiserum-Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung

Bei dieser Versuchsreihe wird die Antikörperkonzentration in der Versuchsanordnung konstant gehalten, und die Antigenkonzentration variiert.

Bei der üblichen Bestimmungsmethode für IgA im Liquor (37) wird das Antiserum 1:5 verdünnt, und 0,2 ml davon mit 0,1 ml Standard-Serum-Verdünnung angesetzt. Das Standard-Serum wird zur Erstellung der Eichkurve von 1:40 bis 1:1280 verdünnt.

Wir erweiterten diese Verdünnungsreihe für unsere Versuche, so daß 1:2, 1:4 usw. bis 1:4096 verdünnt wurde, falls dies erforderlich war. Wir schoben auch dazwischen liegende Verdünnungsstufen ein, wenn dies zur Exploration des Kurvenverlaufs in einem bestimmten Abschnitt nötig war.

Um unspezifische Trübungen zu erkennen, führten wir als Kontrollen bei der Verdünnung des Antiserums, des Standard-Serums usw. einen entsprechenden Ansatz mit, der z.B. keine Antiserum-Verdünnung, sondern statt dessen nur das Medium, z.B. physiologische Kochsalzlösung, und die Standard-Serum-Verdünnung enthielt. Die sich dabei ergebenden Blindwerte dürfen nicht vom Meßergebnis abgezogen werden, da sich sonst falsche Ergebnisse ergeben (37 und 2.7.3.2.).

2.3. Versuche zur Verbesserung der Bestimmung der Immunglobuline im Liquor

2.3.1. Variation der Antiserumkonzentration

Wir untersuchten, welchen Einfluß eine stärkere Verdünnung des Antiserums auf die Lage der Trübungskurve hat. Antiserum-Verdünnungen von 1:10, 1:50 und 1:500 führen zu einer Verschiebung des Äquivalenzpunktes vom Bereich hoher in die Zone niedriger Antigenkonzentrationen (Abb.5). Bei genügend langer Inkubationszeit (18 Stunden) läßt sich die Äquivalenzpunktverschiebung der entsprechenden Antigenkonzentration zuordnen, d.h. eine Zehntelung der Antikörpermenge im Ansatz führt auch zu einer Zehntelung der Antigenmenge, bei der der maximale Trübungsausschlag stattfindet (Abb.5).

2.3.2. Einfluß der Inkubationszeit

Ferner untersuchten wir, welchen Einfluß die Inkubationszeit auf den Kurvenverlauf hat. Wir maßen in vielen verschiedenen Zeitintervallen, von 5 Minuten bis zu mehreren Tagen. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Länge der Inkubationszeit bei der verwendeten doppeltlogarithmischen Auftragsweise sich die beiden Schenkel der LN-Immuntrübungskurve zunehmend linearisieren. Dieser Prozeß ist erst nach circa 18 Stunden abgeschlossen (Abb.6). Mit zunehmender Länge der Inkubationszeit wird auch die Reproduzierbarkeit der Werte im Bereich kleiner Antigenkonzentrationen verbessert. Der Äquivalenzpunkt wird durch die längere Inkubationszeit in die Zone höherer Antigenkonzentrationen verschoben.

Hier ist noch zu erwähnen, daß wir bei Inkubationszeiten von über zwei Stunden, um Sedimentationseffekte der Präzipitate zu beseitigen, die Küvetten einzeln mittels eines Rotormixers auf-

schüttelten und fünf Minuten später die Trübung maßen (s.2.6.).

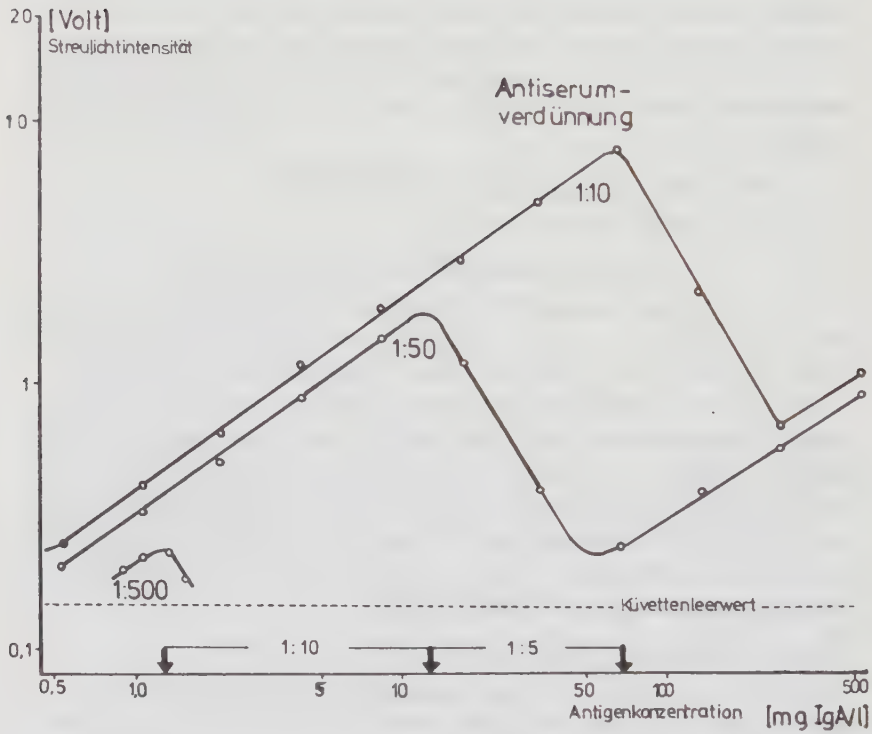

Abb.5 : Äquivalenzpunktverschiebung durch Variation der IgA-Antiserumkonzentration nach achtzehnstündiger Inkubationszeit

Die Pfeile markieren die Antigenkonzentration an den Äquivalenzpunkten der verschiedenen Antiserum-Verdünnungen, die sich proportional zur Antikörperkonzentration vom Bereich hoher zur Zone niedriger Antigenkonzentrationen verschieben. Die Trübung, die einer bestimmten Antigenkonzentration entspricht, ist auch abhängig von der Antikörperkonzentration : Je stärker die Antiserum-Verdünnung ist, desto kleiner ist die Streulichtintensität.

2.3.3. Zusatz von Protamin als Streulicht-verstärkende Substanz

Nachdem wir durch unsere Versuche mit Protamin-Insulin (Depot-Insulin "Horm") (s.2.4.2.) erkannt hatten, daß man Protamin als

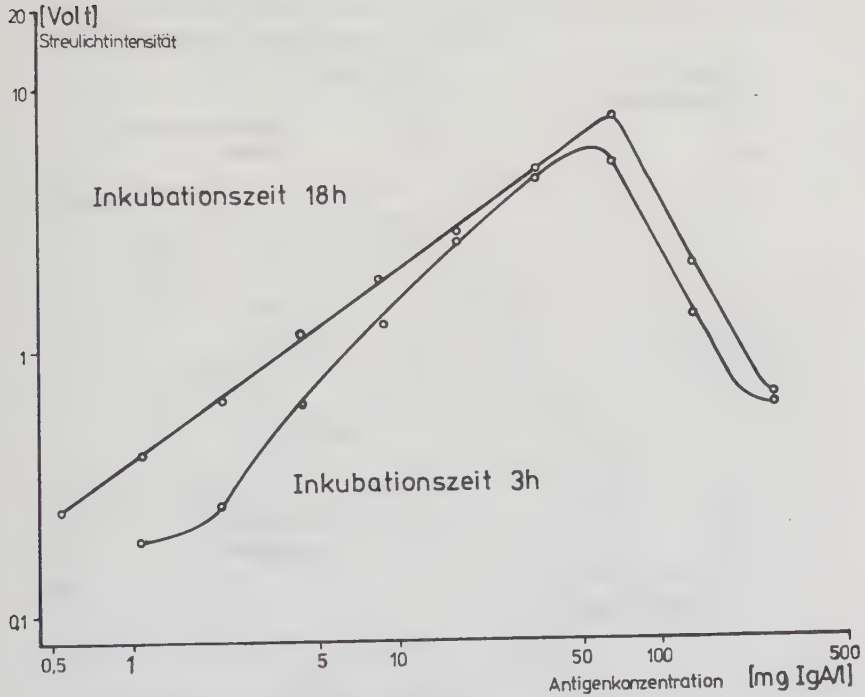

Abb.6 : Verbesserung der Empfindlichkeit durch achtzehnstündige Inkubation

Durch die längere Inkubationszeit werden v.a. die Werte der Punkte mit einem ungünstigen Antigen-Antikörper-Verhältnis, d.h. mit großem Antigen- bzw. Antikörperüberschuß, erhöht. Dadurch wird die zur IgA-Bestimmung nutzbare Zone des Antigenüberschusses bis auf 0,5 mg IgA/l ausgedehnt. Außerdem werden die Schenkel der Kurve durch die lange Inkubationszeit begradigt.

Antiserum-Verdünnung: 1:10

Streulicht-verstärkende Substanz verwenden kann, machten wir Versuche mit verschiedenen Protamin-Verdünnungen (Protamin 1000 "Roche") und LN Protein-Standard-Serum. Im Abschnitt 2.7.1. gehe ich näher auf die Protamine und ihre Eigenschaften ein.

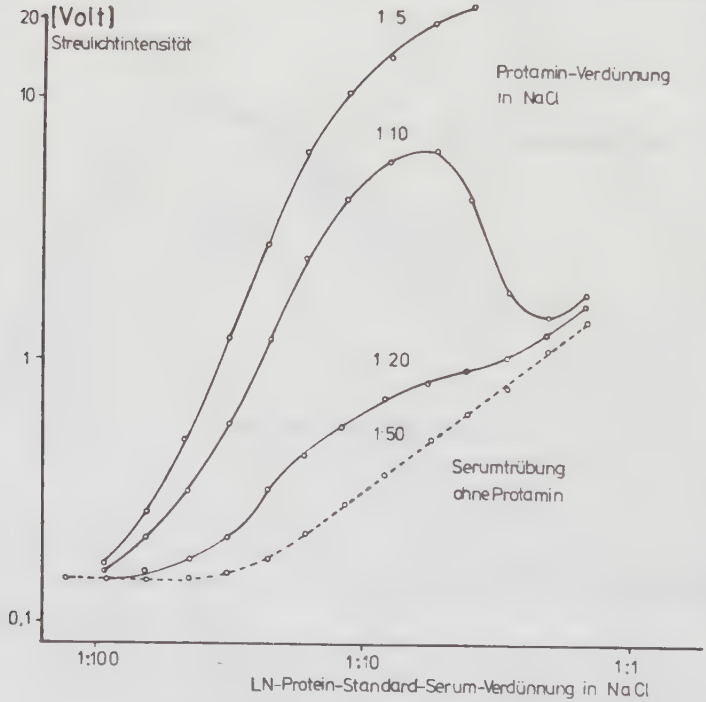

Abb.7 : Reaktion zwischen Serum und Protamin in physiologischer Kochsalzlösung nach achtzehnstündiger Inkubationszeit
Bei zunehmender Protaminkonzentration tritt bei Inkubation mit LN Protein-Standard-Serum ohne Zusatz eines Antiserums eine stärkere Streulichtintensität auf. Bei einer Protamin-Verdünnung von 1:50 ist die Kurve nicht von der ohne Protaminzusatz zu unterscheiden.

2.3.3.1. Versuche mit physiologischer Kochsalzlösung als Inkubationsmedium

Inkubationsansatz:

0,1 ml Standard-Serum-Verdünnung als Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml Protamin-Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung

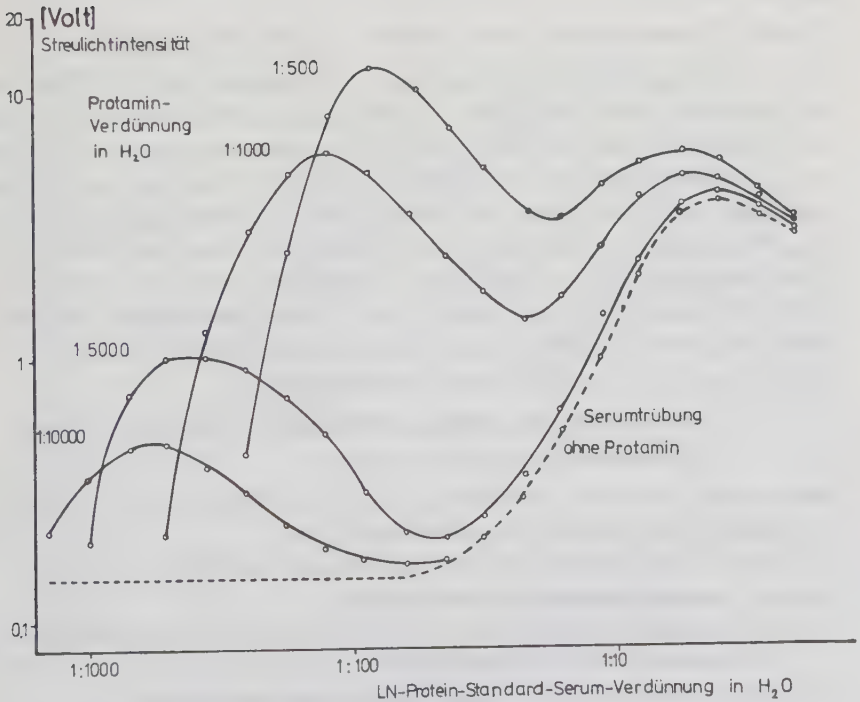

Abb.8 : Reaktion zwischen Serum und Protamin in Aqua bidest. nach achtzehnstündiger Inkubationszeit

Durch die Verminderung der Ionenstärke im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung (Abb.7) tritt eine Präzipitation schon bei niedrigeren Protaminkonzentrationen auf.

Bei diesen Versuchen wurden ganz allgemein die Reaktionen zwischen Protamin und dem Standard-Serum untersucht, ohne daß dabei Antikörper gegen humanes Immunglobulin im Inkubationsgemisch waren.

Mit zunehmender Protaminkonzentration tritt dabei eine zunehmende Streulichtverstärkung auf. Allerdings darf das Protamin nicht zu stark verdünnt werden, da z.B. bei einer Verdünnung von 1:50, das sind circa 0,25 mg Protaminchlorid pro Milliliter, keine Streulichtverstärkung mehr wahrnehmbar ist. Bis zu einer Verdünnung von 1:20 ist sie bei diesem Ansatz sicher meßbar (s. Abb.7).

2.3.3.2. Versuche mit Aqua bidest. als Inkubationsmedium

Um den Einfluß der Ionenstärke auf die Reaktion zwischen Protamin und den Immunglobulinen zu sehen, verwendeten wir in weiteren Versuchen Aqua bidest. statt physiologischer Kochsalzlösung als Inkubationsmedium. Es zeigte sich, daß je größer die Protaminmenge ist, desto stärker ist die Präzipitation. Es ist wichtig festzuhalten, daß bei diesen Versuchen schon bei einer Protamin-Verdünnung von 1:20000 ein Streulicht-verstärkender Effekt festgestellt werden kann, das ist ein Tausendstel der bei physiologischer Kochsalzlösung als Medium nötigen Menge. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

2.3.3.3. Durch Protaminzusatz optimierter Ansatz zur Bestimmung von IgA im Liquor

Der Ansatz, der von uns nach einigen Variationen als am besten befunden wurde, sieht folgendermaßen aus:

0,1 ml LN Standard-Serum als Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml Antiserum gegen IgA in Phosphatpuffer (Zusammensetzung siehe S.12) 1:10 verdünnt

0,1 ml Protamin 1:50 in Aqua bidest. verdünnt

Inkubationszeit: 3 Stunden

Mit diesem Ansatz erstellt man die Eichkurve. Bei der Bestimmung von IgA im Liquor wird statt der Standard-Serum-Verdünnung 0,1 ml unverdünnter Liquor in die Küvette gegeben.

Vergleicht man die Laser-nephelometrische Immuntrübungskurve, die sich nach Protaminzusatz ergibt, mit der üblichen ohne

Protamin, so linearisiert sich die Eichkurve schneller nach Protaminzusatz (Abb.9). Die Eichkurve ist nach drei Stunden bereits in dem Endzustand, den sie ohne Protamin erst nach 18 Stunden erreicht.(Vergleiche Abb.6 und Abb.9) Ferner verschiebt sich der Äquivalenzpunkt in den Bereich höherer Antigenkonzentrationen.

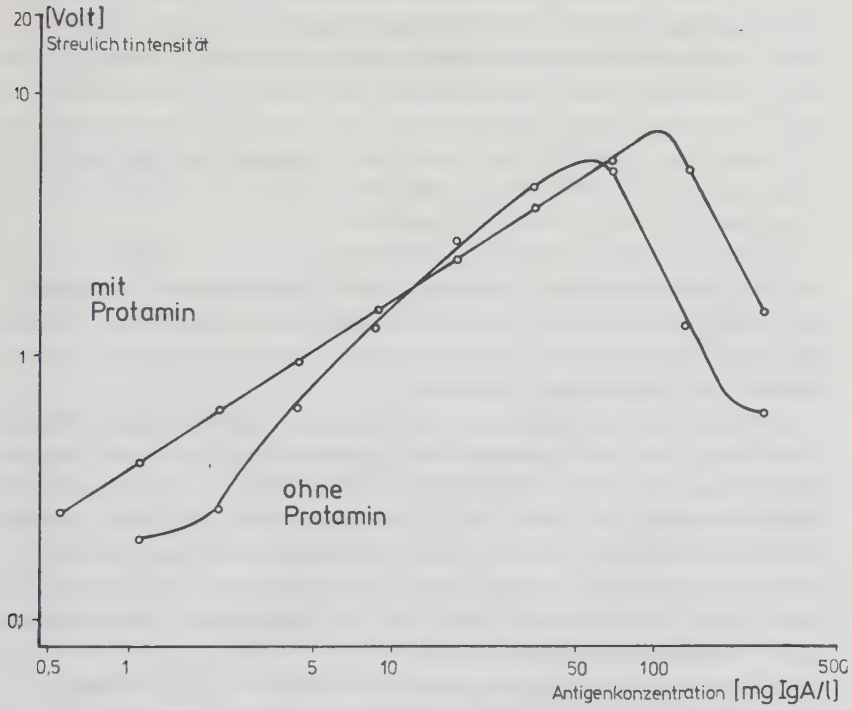

Abb.9 : Verbesserung der Empfindlichkeit durch Zusatz von Protamin bei einer Inkubationszeit von drei Stunden
Der Meßbereich, d.h. der Antikörperüberschuß-Bereich, wird durch den Protaminzusatz sowohl im Bereich kleiner, als auch in der Zone großer Antigenkonzentrationen erweitert. Es kommt durch den Zusatz von Protamin zu einer Äquivalenzpunktverschiebung.
Antiserum-Verdünnung: 1:10, Protamin-Verdünnung: 1:50

Welche unspezifischen Trübungseffekte Protamin bei Zusatz von Liquor in den Inkubationsansatz bewirkt, prüften wir mit folgender Versuchsanordnung:

0,1 ml Liquor (unverdünnt)
0,1 ml LN Protein-Standard-Serum 1:10 in Phosphatpuffer verdünnt (anstelle des Antiserums)
0,1 ml Protamin 1:50 in Aqua bidest. verdünnt bzw. Aqua bidest. ohne Protaminzusatz

Es wurden nur Liquores verwendet, deren Eigentrübung unter 0,15 Volt lag. Bei dieser Versuchsanordnung ist keine Trübung durch Antigen-Antikörper-Komplexe zu erwarten. Unter diesen Bedingungen ließ sich keine zusätzliche Trübung beim Zusatz von Protamin bei allen 100 untersuchten Liquores feststellen.

Wir machten mit dem oben erwähnten optimierten Ansatz einige Versuche, um seine Güte zu beweisen:

Wir bestimmten in 100 unselektierten Liquores, die in das Labor der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg eingingen, den IgA-Gehalt. Dieser lag bei einem durch Zusatz von Protamin optimierten Ansatz in allen Fällen in dem eindeutigen, linearisierten Bereich der Eichkurve.

Als Kontrolle untersuchten wir 30 davon nochmals ohne Protaminzusatz und korrelierten die Ergebnisse mit und ohne Protaminzusatz. Bei den vergleichbaren Proben ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,9875. Es mußte dabei beachtet werden, daß nur Proben mit einer IgA-Konzentration von über 1 mg/l verwendbar waren, da dies die untere Meßgrenze für die Bestimmung ohne Protaminzusatz ist. Für die Proben mit Protaminzusatz liegt diese bei 0,3 mg/l.

Um die Leistungsfähigkeit unseres Ansatzes v.a. in der Zone kleiner Antigenkonzentrationen zu überprüfen, verdünnten wir 70 Liquorproben im Verhältnis 1:2 und 1:6. Beim Vergleich der Werte, die zu erwarten waren, und den tatsächlich gemessenen Werten für beide Verdünnungen ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,9631.

2.3.3.4. Durch Protaminzusatz optimierter Ansatz zur Bestimmung von IgM im Liquor

Als bester der Ansätze, die wir erprobten, stellte sich der

folgende heraus:

0,1 ml LN Protein-Standard-Serum als Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml Antiserum gegen IgM 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt

0,1 ml Protamin 1:50 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt

Inkubationszeit: 3 Stunden

Zum Aufstellen der Standardkurve (Abb.10) werden Standard-Serum-Verdünnungen von 1:4, 1:8 usw. bis 1:4096 verwendet. Bei

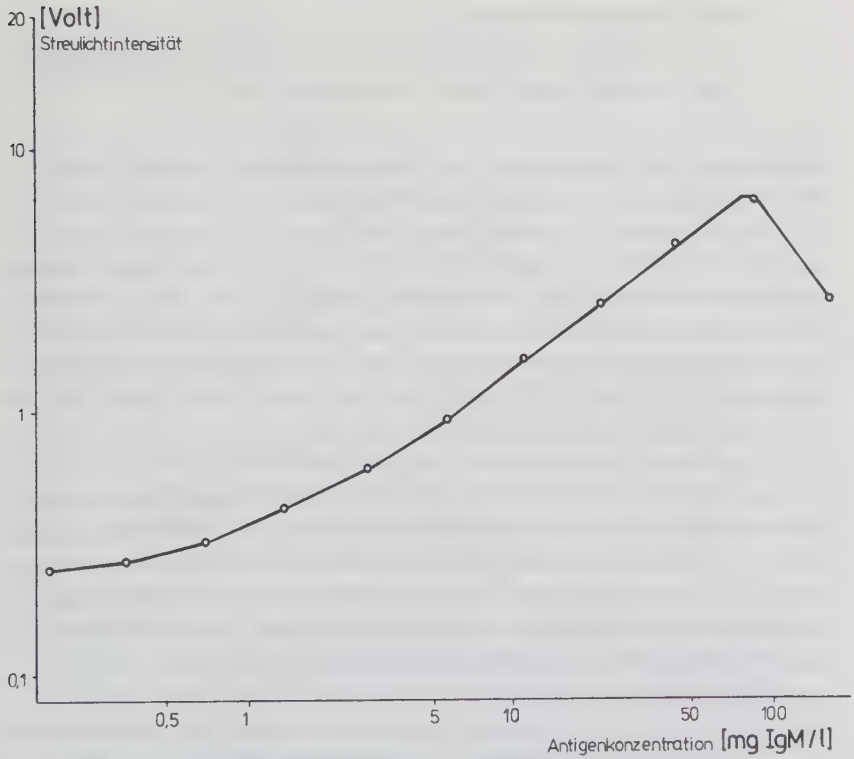

Abb.10 : Standardkurve für die durch Protaminzusatz optimierte Bestimmung von IgM im Liquor bei dreistündiger Inkubationszeit

der Bestimmung des IgM-Gehaltes von Liquorproben wird statt der Standard-Serum-Verdünnung 0,1 ml unverdünnter Liquor in die Küvette gegeben.

Auch hier erprobten wir den oben erwähnten Phosphatpuffer, jedoch brachte dieser hier gegenüber physiologischer Kochsalzlösung als Inkubationsmedium keine Vorteile.

Wir untersuchten 100 unselektierte Liquores mit dieser Methode. Dabei stellte sich heraus, daß nur bei 60 Proben eine IgM-Bestimmung möglich war. Bei 40 Proben war der IgM-Gehalt kleiner als die untere Grenze dieses Meßverfahrens (0,8 mg IgM/l).

2.4. Versuche zur Laser-nephelometrischen Bestimmung des Äquivalenzpunktes

2.4.1. Verschiebung des Äquivalenzpunktes bei IgM-Antiseren mit unterschiedlichen Antikörpertitern

Bei den Versuchen im IgA-Anti-IgA-System zeigte sich, daß bei Verdünnung des Antiserums mit physiologischer Kochsalzlösung der Äquivalenzpunkt entsprechend verschoben wurde (s. Abb.5).

Um nun Seren mit unterschiedlichem Gehalt an Antikörpern simulieren zu können, verdünnten wir ein Antiserum gegen humanes IgM vom Kaninchen mit normalen Kaninchen-Serum. Wir wählten das IgM-Anti-IgM-System, da das IgM von allen Immunglobulinen, die wir bestimmten, im Serum in der geringsten Konzentration vorhanden ist. Wir fürchteten nämlich, daß Immunglobuline des Kaninchen-Serums kreuzreagieren könnten.

Wir mischten IgM-Antiserum, das mit physiologischer Kochsalzlösung 1:5 verdünnt worden war, mit einem ebenso verdünnten Kaninchen-Normal-Serum im Verhältnis 1:1. Die Antikörper waren also 1:10 verdünnt, das Kaninchen-Serum nur 1:5. Ferner mischten wir 1:20 verdünntes Antiserum 1:1 mit 1:20 verdünntem Kaninchen-Normal-Serum und erhielten so eine Antikörper-Verdünnung von 1:40 bei einer Serum-Verdünnung von 1:20.

Der Inkubationsansatz war:

0,1 ml LN Protein-Standard-Serum-Verdünnung als Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung
0,1 ml Antiserum-Kaninchen-Serum-Gemisch
0,1 ml physiologische Kochsalzlösung
Inkubationszeit: 18 Stunden

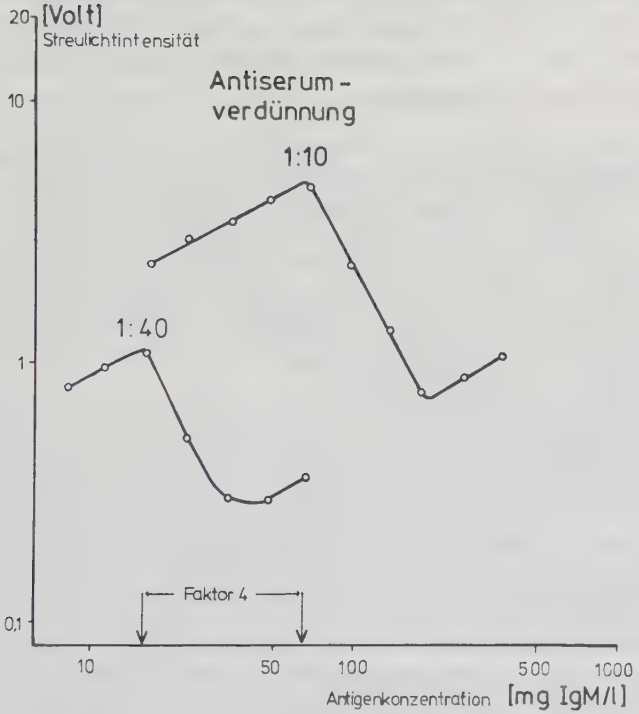

Abb.11 : Äquivalenzpunktverschiebung bei verschiedenem Gehalt an Antiserum und Kaninchen-Serum (humanes IgM-Anti-IgM-System)

Die Äquivalenzpunktverschiebung richtet sich auch hier nur nach dem Gehalt an Antikörpern. Die Äquivalenzpunkte liegen auch hier zueinander entsprechend dem Antikörpertiter, trotz der Verdünnung der Antiseren durch Kaninchen-Normal-Serum.

Der Antikörper-Verdünnung 1:10 entspricht eine Kaninchen-Serum-Verdünnung von 1:5, und der von 1:40 eine von 1:20.

Inkubationszeit: 18 Stunden

Es zeigte sich, daß die Äquivalenzpunktverschiebung auch hier entsprechend der effektiven Antikörperkonzentration erfolgte, d.h. der Äquivalenzpunkt für die 1:40 Verdünnung des Antiserums lag bei 15 mg IgM/l, und der für die 1:10 Verdünnung bei 60 mg IgM/l (Abb.11), wie dies zu erwarten war.

2.4.2. Versuche zur Bestimmung von Insulin-Antikörpern

Da diese Versuche nicht zu einem erfolgreichen Abschluß gebracht werden konnten, möchte ich mich hier kurzfassen.

Bei der Inkubation einer Altinsulin-Verdünnungsreihe und Seren von Menschen und Kaninchen, die Antikörper gegen Insulin vom Rind bzw. Schwein enthielten, zeigte sich, daß die Immunkomplexe keine Verstärkung der Laser-nephelometrischen Trübung machten. Wir führten diese Versuche sowohl für Insulin vom Rind als auch vom Schwein durch.

Daher verwendeten wir für unseren weiteren Versuche Depot-Insuline: Depot-Insulin "Horm", eine klare Lösung von chromatographisch gereinigtem Protamin-Zink-Insulin und Kristallinsulin vom Rind als Komplex, und Depot-Insulin Hoechst klar, eine klare Lösung aus chromatographisch gereinigtem Kristallinsulin und Aminochinurid (Surfen) als Komplex. Diese liegen als saure, klare Lösung (pH=3,0 bzw. 3,5) vor und geben als Komplexe bei pH-Werten im physiologischen Bereich deutliche Trübungsausschläge, die vom pH, der Molarität und der Art des verwendeten Puffers abhängen. Wir machten Versuche mit Aqua bidest., physiologischer Kochsalzlösung, Phosphatpuffern, Trispuffern und MOPS-Puffern. Es war jedoch bei Inkubation mit den Antiseren nicht möglich, einen Äquivalenzpunkt zu finden und so mit der Methode der Äquivalenzpunktverschiebung eine Bestimmungsmöglichkeit für Insulin-Antikörper angeben zu können.

2.4.3. Versuche mit kreuzreagierenden Substanzen

Um die Wirkung von Kreuzreaktionen zu studieren, unternahmen wir u.a. folgende Versuche:

Wir inkubierten Antiserum vom Kaninchen gegen humanes Albumin, das mit physiologischer Kochsalzlösung 1:10, 1:20 und 1:40 verdünnt wurde, mit einer Standard-Serum-Verdünnungsreihe. Ferner wurde noch Albumin vom Rind in 100fach, 500fach und 1000fach größerer Menge als Humanalbumin der Standard-Serum-Verdünnung

beigeben, so daß sich folgender Ansatz ergab:

0,1 ml humanes LN Protein-Standard-Serum und bovines Albumin
0,1 ml Antiserum gegen humanes Albumin verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung
0,1 ml physiologische Kochsalzlösung

Zum Vergleich wurde der gleiche Ansatz ohne Zugabe von bovinem Albumin angesetzt.

Da das kreuzreagierende Antigen, das bovine Albumin, zusammen mit dem Standard-Serum verdünnt wurde, war das Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Antigen stets konstant.

Bestimmt man nach zwei Stunden Inkubationszeit die Äquivalenzpunktverschiebung, die sich durch das kreuzreagierende bovine Albumin ergibt, und berechnet daraus die Kreuzreaktion, so erhält man für jede der drei Verdünnungen ein anderes Ergebnis (Abb.12). Nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubationszeit erhält man aber ein übereinstimmendes Ergebnis (Abb.13).

Je weniger Antikörper und je mehr kreuzreagierende Substanzen im Inkubationsgemisch sind, um so länger wird die endgültige Einstellung des Äquivalenzpunktes verzögert.

Wir hatten ein Albumin-Anti-Albumin-System gewählt, da bei allen Immunglobulin-Anti-Immunglobulin-Systemen Antigen und Antikörper immunologisch gesehen verwandt sind, da beide Immunglobuline sind.

Um die Kreuzreaktionen der Immunglobuline untereinander zu studieren, machten wir folgenden Versuch:

Wir fügten dem IgA-Anti-IgA-System reines humanes IgG in einer zehnmal höheren Konzentration, wie sie im LN Standard-Serum vorhanden ist, hinzu und bekamen dadurch eine Verschiebung des Äquivalenzpunktes, wie sie bei einer um 10 Prozent höheren IgA-Antiserum-Konzentration zu erwarten gewesen wäre, d.h. der Äquivalenzpunkt verschob sich, ähnlich wie dies in Abbildung 13 für das Albumin-System gezeigt wurde, in den Bereich höherer Antigenkonzentrationen.

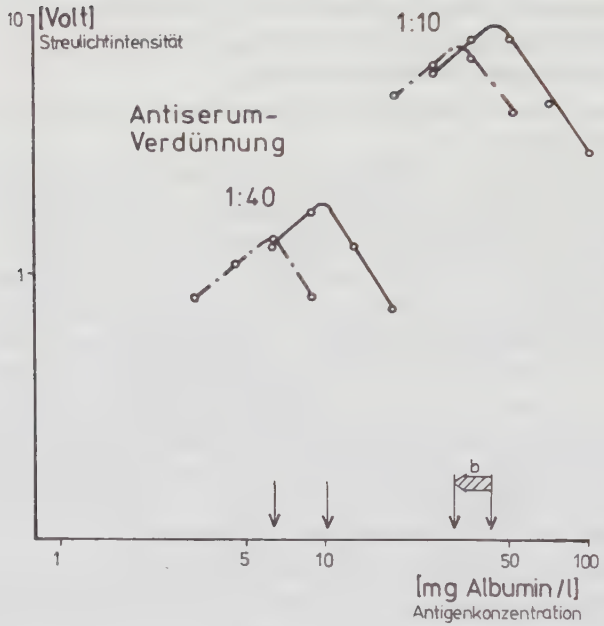

Abb.12 : Äquivalenzpunktverschiebung durch kreuzreagierendes bovines Albumin in einem humanes Albumin-Anti-Albumin-System

I. Nach zwei Stunden Inkubationszeit

Trotz des gleichen Verhältnisses von Humanalbumin zu bovinem Albumin in beiden Ansätzen (Antiserum-Verdünnungen 1:10 und 1:40) kommt es zu einer verschieden starken Äquivalenzpunktverschiebung. Bei der gewählten Abbildungsweise auf doppeltlogarithmischen Papier müßte sich jeweils zwischen den beiden Antiserum-Verdünnungen der gleiche Abstand (b) ergeben. Dies ist aber erst nach 24 Stunden der Fall (Abb.13). Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Ansatz, dem bovines Albumin in 1000fach höherer Konzentration als das humane Albumin im Gemisch zugesetzt wurde, die andere den ohne Albumin.

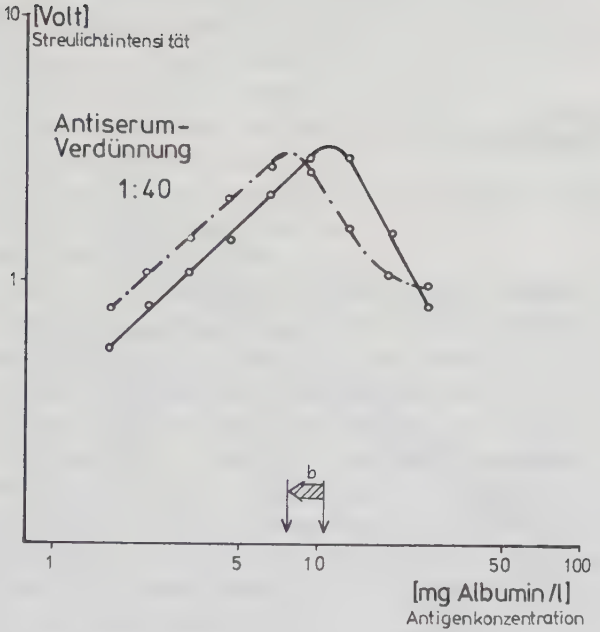

Abb. 13 : Äquivalenzpunktverschiebung durch kreuzreagierendes bovines Albumin in einem humanes Albumin-Anti-Albumin-System

II. Nach 24 Stunden Inkubationszeit

Jetzt ist auch bei der Antiserum-Verdünnung von 1:40 die Äquivalenzpunktverschiebung auf den Abstand b zurückgegangen, d.h. nach 24 Stunden ist für beide Antiserum-Verdünnungen die Äquivalenzpunktverschiebung durch das kreuzreagierende bovine Albumin gleich stark.

Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Ansatz, dem bovines Albumin in 1000fach höherer Konzentration als das humane Albumin zugesetzt wurde, die andere den ohne bovines Albumin.

2.5. Versuche zur LN-Immunoassay im trüben Medium

Wir untersuchten den Einfluß Streulicht-verstärkender bzw. -abschwächender Substanzen in einem IgA-Anti-IgA-System (Abb.14).

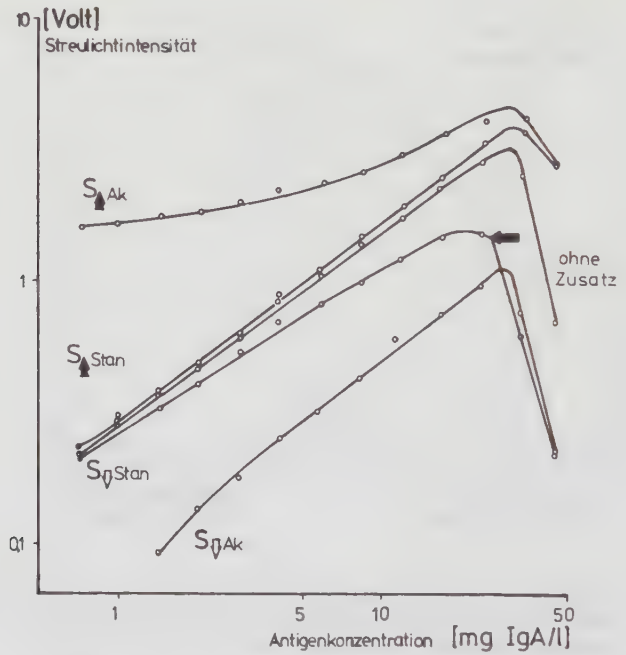

Abb.14 : Einfluß von Streulicht-verstärkenden bzw. abschwächenden Substanzen auf die Laser-nephelometrischen Immuntrübungskurve am Beispiel eines IgA-Anti-IgA-Systems

Die Kurve S ↑ Ak zeigt das Ergebnis folgenden Versuchs: Wir fügten eine Streulicht-verstärkende Substanz (Detritus) zum Antiserum, d.h. die Menge des Detritus war in allen Küvetten des Ansatzes gleich.

Wir verdünnten den Detritus mit dem Normal-Serum zusammen in physiologischer Kochsalzlösung (S ↑ Stan.), d.h. die Menge des Detritus nahm in allen Küvetten entsprechend der Abnahme des Antigengehalts ab.

Durch den Zusatz von Patentblau zum Antiserum kam es zu einer Streulichtabschwächung (S ⇩ Ak).

Setzte man Streulicht-abschwächendes Patentblau der Standard-Serum-Verdünnungsreihe zu (S ⇩ Stan.), so kam es außer zu einer Streulichtabschwächung noch zu einer Verschiebung des Äquivalenzpunktes. Letztere konnte durch zusätzliche Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgehoben werden.

Die mittlere Kurve kennzeichnet den normalen Verlauf der Immuntrübungskurve ohne Zusätze.

Inkubationszeit: 18 Stunden

Wir wollten die Antigenkonzentration mittels einer Äquivalenzpunktbestimmung im trüben Medium messen. Besser als die bisherige Versuchsanordnung mit einer Antigen-Verdünnungsreihe ist eine Antiserum-Verdünnungsreihe dafür geeignet, bei der die unbekannte Antigenkonzentration konstant gehalten werden kann.

Zuerst untersuchten wir das Verhalten der Kurven im klaren Medium. Als ausreichend für die Bestimmung des Äquivalenzpunktes erwieß sich eine Verdünnungsreihe mit wenigen Antiserum-Verdünnungsstufen, da sich auch hier bei einer Inkubationszeit von 18 Stunden die Kurven parallel - je nach dem Antigengehalt im Ansatz verschieben (Abb.16, S.32).

Wir wählten dafür folgenden Ansatz:

0,1 ml Antiserum gegen IgA als Verdünnungsreihe (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml LN Standard-Serum-Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung

Es wurden mehrere Standard-Serum-Verdünnungen untersucht. In Abbildung 16 sind als Beispiel die Verdünnungen mit 25 mg IgA/l, 50 mg IgA/l und 100 mg IgA/l dargestellt. Will man kleinere Antigenkonzentrationen bestimmen, so muß man andere Antiserum-Verdünnungsstufen wählen (s.u.).

Um bei unbekannten Antigenkonzentrationen zu einem Ergebnis zu kommen, bestimmten wir mittels des folgenden Ansatzes zuerst die Äquivalenzpunkte der ausgewählten Antiserum-Verdünnungsstufen, die bei der Antiserum-Verdünnungsreihe verwendet wurden:

0,1 ml Standard-Serum als Verdünnungsreihe in physiologischer

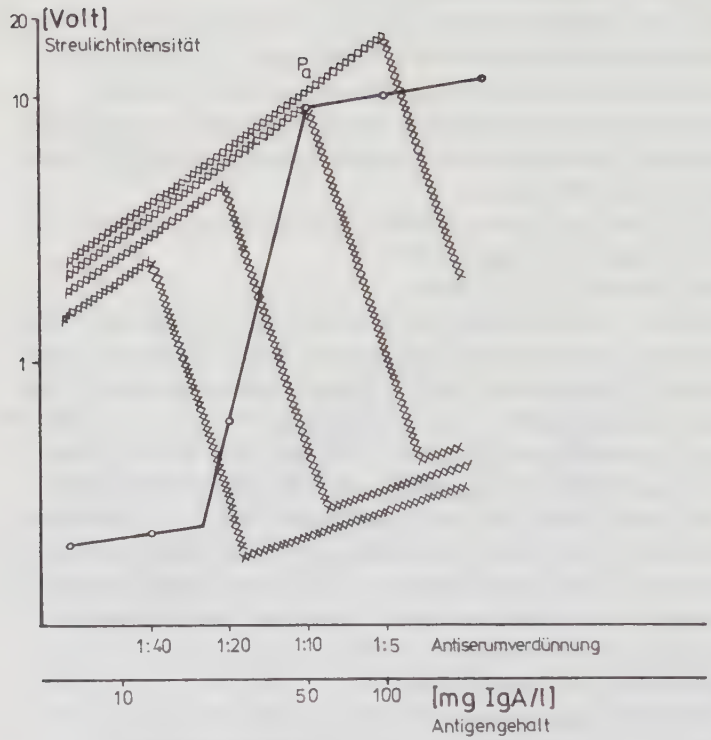

Abb.15 : Erstellung einer Bezugsskala zur Bestimmung einer unbekannten Antigenkonzentration mittels einer Antiserum-Verdünnungskurve

Außer der in Abbildung 16 angeführten Möglichkeit zur Erstellung einer Antigenskala kann man auch mittels mehrerer Antigen-Verdünnungsreihen (schraffierte Linien) dazu kommen. Da man hier den Antigengehalt des Äquivalenzpunktes einer bestimmten Antikörperkonzentration kennt, kann man so der jeweiligen Antigenkonzentration die entsprechende Antikörperkonzentration zuordnen.

Hat man nun z.B. eine Serumprobe mit einer unbekannten IgA-Konzentration (durchgezogene Linie), so kann man ihre Immuntrübungskurve entsprechend der Antiserum-Verdünnungs-

Skala auftragen, den Äquivalenzpunkt bestimmen und das Ergebnis auf der Antigenskala ablesen.

Antiserum-Verdünnungen der Antigen-Verdünnungsreihen (schraffierte Linien): 1:5, 1:10, 1:20, 1:40

Inkubationszeit: 18 Stunden

0,1 ml Standard-Serum als Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml Antiserum gegen IgA verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung

Dieser Ansatz wurde für alle vier Antiserum-Verdünnungsstufen (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) durchgeführt. Dadurch bekam man die Antigenmenge in mg IgA/l, die dem Äquivalenzpunkt einer bestimmten Antiserumverdünnung zuzuordnen ist. Mittels der vier auf diese Weise erhaltenen Punkte kann man eine Skala für die Antigenmenge der Äquivalenzpunkte aufstellen (Abb.15) und dort das Ergebnis ablesen.

Natürlich kann man auch mittels des oben erwähnten Ansatzes mit einer Antiserum-Verdünnungsreihe und Zusatz von bekannten Antigenkonzentrationen zum gleichen Ergebnis kommen (Abb.16). Wir bestimmten die Äquivalenzpunkte auf zwei Weisen, um zu zeigen, daß man mit beiden Methoden den gleichen Äquivalenzpunkt erhält, wenn man Antigen- und Antikörperkonzentration entsprechend wählt.

Als Beispiel für eine Anwendung der Äquivalenzpunktbestimmung im trüben Medium bestimmten wir den IgA-Gehalt von Mammazystenflüssigkeit:

Ansatz:

0,1 ml Antiserum gegen IgA als Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) in physiologischer Kochsalzlösung

0,1 ml LN Protein-Standard-Serum verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung (mit 12,5 mg IgA/l)

0,1 ml Zystenpunktat 1:10 verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung (bzw. nur physiologische Kochsalzlösung)

Inkubationszeit: 18 Stunden

Aus der Äquivalenzpunktverschiebung zwischen den beiden Kurven mit und ohne Zystenpunktat (Abb.17) ließ sich der IgA-Gehalt des Mammazystenpunktates bestimmen:

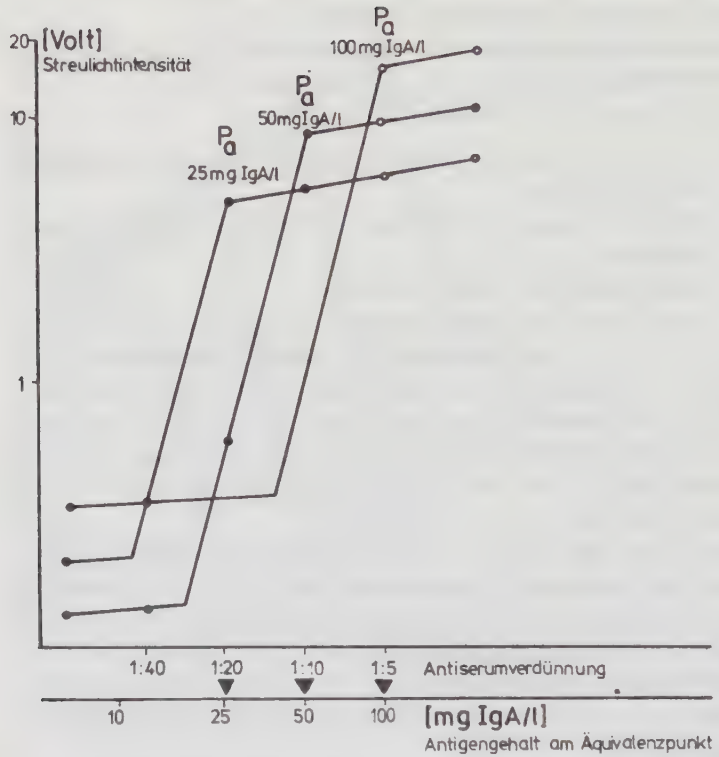

Abb.16 : Die Äquivalenzpunkte von bestimmten IgA-Konzentrationen nach achtzehnstündiger Inkubation mit einer Antiserum-Verdünnungsreihe

Hier wird die Antigenkonzentration (z.B. 100 mg IgA/l) konstant gehalten, und die Antiserumkonzentration variiert. Am Äquivalenzpunkt (P_a) tritt ein steiler Abfall der Kurve auf. Wie bei den Kurven mit einer Antigen-Verdünnungsreihe (Abb.5) verlaufen auch hier bestimmte Abschnitte der Kurven parallel zueinander. Dies läßt sich übrigens mathematisch aus dem abschnittsweise parallelen Verlauf der Kurven der Antigen-Verdünnungsreihe fordern.

Da die Äquivalenzpunkte bestimmten Antigenkonzentrationen (25 mg IgA/l, 50 mg IgA/l, 100 mg IgA/l) entsprechen, läßt

sich eine zweite Skala angeben, auf der der Antigengehalt am Äquivalenzpunkt aufgetragen wird. Diese kann dann zur Bestimmung einer unbekannten Antigenkonzentration mit der gleichen Antiserum-Verdünnungsreihe herangezogen werden.

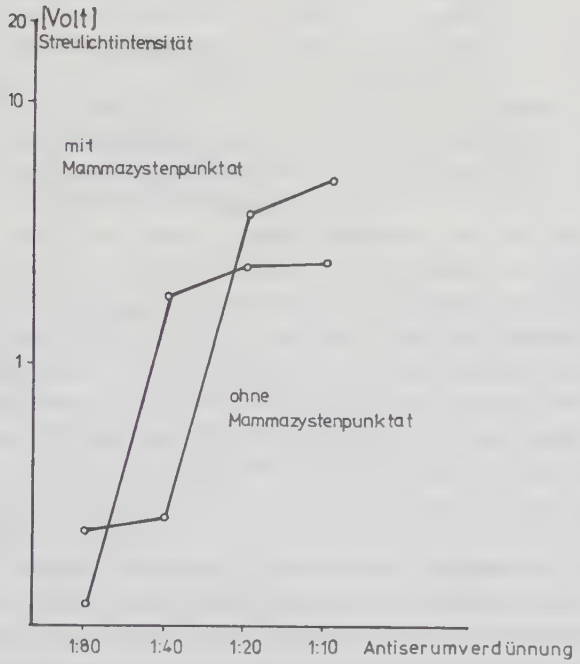

Abb.17 : Bestimmung von IgA in Mammzystenpunktat
Wir bestimmten den Äquivalenzpunkt einer Standard-Serumverdünnung mit 12,5 mg IgA/l und setzten einer weiteren Antiserum-Verdünnungsreihe zusätzlich noch Mammazystenpunktat zu, dadurch kam es zu einer Verschiebung des Aquivalenzpunktes, aus der auf den IgA-Gehalt des 1:10 verdünnten Mammazystenpunktates geschlossen werden konnte.

Man ließt aus dem Graphen (Abb.17) ab: die Antiserumverdünnung am Äquivalenzpunkt ohne Zystenpunktat = $Ak_{Stan.}$, die Antiserum-

verdünnung am Äquivalenzpunkt mit Zystenpunktat = $Ak_{Zyst.}$. Der Antigengehalt, der dem Aquivalenzpunkt ohne Zystenpunktat entspricht, ist bekannt (im Beispiel $IgA_{Stan.}$ = 12,5 mg IgA/l). Daraus kann man mittels der folgenden Formel den IgA-Gehalt der Mammazystenflüssigkeit errechnen:

$$IgA_{Zyst.} = \left(\frac{Ak_{Zyst.}}{Ak_{Stan.}} \times IgA_{Stan.} - IgA_{Stan.} \right) \times 10$$

2.6. Zur Resuspension bei Langzeitinkubation

Die Immunkomplexe, die bei der Laser-Nephelometrie gemessen werden, fallen nach einiger Zeit aus. Mißt man, ohne aufzuschütteln, z.B. die Reaktion im IgA-Anti-IgA-System im mittleren Bereich der Immuntrübungskurve, so bekommt man nach circa zwei Stunden einen maximalen Meßwert, der nach drei Stunden wieder langsam zurückgeht. Inkubiert man z.B. 18 Stunden lang und bringt die Küvette ohne Erschütterung in das Gerät zum Messen, so kann es sein, daß man nur noch den Trübungswert des Mediums mißt. Dies bedeutet, daß sich alle Präzipitate im Bodensatz der Küvette befinden, über den der Laserstrahl hinweggeht. Ähnlich ist es auch bei der Messung der Trübung der ionalen Komplexe zwischen Protamin und Insulin bzw. Protamin und Heparin.

Resuspensiert man diesen Bodensatz mit einem Rotormixer und versucht, unmittelbar danach die Trübung zu messen, so bekommt man kein richtiges Ergebnis, da die Digitalanzeige des Laser-Nephelometers nicht auf einem bestimmten Wert stehen bleibt, sondern ständig wechselt. Wartet man nach dem Aufschütteln fünf Minuten mit dem Messen, so bekommt man einen konstanten Meßwert. Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen überein, die nach kürzeren Inkubationszeiten ohne Aufschütteln gemessen werden können, falls diese Werte trotz der längeren Inkubationszeit gleich bleiben.

2.7. Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Literatur

2.7.1. Möglichkeiten zur Verbesserung der Methode zur Bestimmung von IgA und IgM im Liquor

Die Laser-nephelometrische Bestimmung von IgA und IgM im Liquor war bisher wegen der unzureichenden Empfindlichkeit der Methoden etwas problematisch, z.B. 1,2 mg IgA/l und 0,8 mg IgM/l als untere Grenze bei SCHLIEP et al. (30). Für andere Nephelometer, die mit einem Fluorometer arbeiten, sieht es noch schlechter aus, z.B. 3 mg IgA/l und 6 mg IgM/l (33).

Zunächst versuchten wir, durch Variation der Antiserumkonzentration und Verlängerung der Inkubationszeit die Empfindlichkeit zu verbessern; dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

- Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit von zwei auf 18 Stunden wird die Empfindlichkeit wesentlich verbessert. In Abbildung 6 wird eine Eichkurve nach dreistündiger Inkubationszeit mit einer nach 18 Stunden Inkubationszeit verglichen.
- Ferner versuchten wir, durch Verwendung kleinerer Antikörperkonzentrationen die Empfindlichkeit der IgA-Bestimmung im Liquor zu verbessern. Dies führte nicht zu dem gewünschten Erfolg, da
  1. durch die Verschiebung des Äquivalenzpunktes in die Zone kleiner Antigenkonzentrationen der Meßbereich für hohe Liquorkonzentrationen an IgA eingeschränkt wird.
  2. es durch die geringere Antikörperkonzentration zu einer verminderten Streulichtintensität kommt (Vgl. Abb.5).

Verwendet man eine verlängerte Inkubationszeit von 18 Stunden, so ist es möglich, statt 0,2 ml einer 1:5 Verdünnung (wie 33, 38), 0,1 ml einer 1:10 Verdünnung des Antiserums zu verwenden, d.h. man verbraucht nur 0,01 ml statt 0,04 ml Antiserum je Probe. Man kann damit also Antiserum einsparen, muß dafür aber länger auf die Ergebnisse warten. Dies bedeutet den Verlust eines der wichtigsten Vorteile der Laser-Nephelometrie gegenüber der radialen Immundiffusion. Durch den Zusatz von Protamin ist es möglich, diesen Nachteil aufzuheben.

Verwendet man Protamin als Zusatz zum IgA-Anti-IgA-System, so kann man folgendes beobachten:

1. Eine starke Beschleunigung der Antigen-Antikörper-Reaktion: Die Eichkurve ist bereits nach drei Stunden voll linearisiert. Ohne Protamin würde man 18 Stunden benötigen, um einen entsprechenden Zustand zu erreichen (Vgl. Abb.6 und Abb.9).
2. Der Äquivalenzpunkt wird in die Zone höherer IgA-Konzentrationen verschoben. Deßhalb hat man einen erweiterten Meßbereich, bzw. man kann die Antiserumkonzentration halbieren, da sich der Äquivalenzpunkt ungefähr auf das doppelte der ursprünglichen IgA-Konzentration am Trübungsmaximum verschiebt.
3. Es ergibt sich eine Streulicht-verstärkende Wirkung v.a. im Bereich kleiner Antigenkonzentrationen, welche vom Ionenmilieu (Vgl. Abb.7 und Abb.8), der vorhandenen Immunglobulinkonzentration und der Protaminkonzentration abhängt. Sie erlaubt es kleinere Antigen-Antikörper-Komplex-Konzentrationen zu messen.

Bei den Protaminen handelt es sich um eine Gruppe stark basischer Nucleoproteine mit einem Molekulargewicht von circa 5000, die einen hohen Anteil an Arginin in ihrer Aminosäurensequenz aufweisen (2). Sie bilden salzartige Komplexe mit einer Reihe von Säuren, so wurde u.a. über die Komplexbildung mit Nucleinsäuren (41), Fettsäuren(16), Polysacchariden (28) und Proteinen berichtet. Bei letzteren bilden sie mit den γ-Globulinen (22) und Insulin (14) Komplexe; Albumin präzipitieren sie nur in denaturiertem Zustand.

ANDO et al. (2) schreiben dazu, daß die meisten dieser Präzipitate durch Zugabe von Salzen wieder auflösbar sind, und diese Eigenschaft zur Reinigung von Verunreinigungen und zur Konzentrierung bestimmter Materialien während des Reinigungsvorganges angewendet wird. Welchen Einfluß die Salzkonzentration im Medium auf den Präzipitationsvorgang hat, ist auch aus unseren Versuchen mit verschiedenen Medium (s. Abb.7 und Abb.8) zu erkennen.

Die Streulicht-verstärkende Wirkung von Protamin beruht wahrscheinlich auf einer Komplexbildung. Die Komplexe zwischen rei-

nem IgG, IgA, IgM bzw. Insulin und Protamin sind Laser-nephelometrisch meßbar, wie wir bei entsprechenden Versuchen feststellten.

Wir machten Versuche zum Ausschluß unspezifischer Trübungen durch den Zusatz von Protamin. Daraus läßt sich sagen, daß ein Zusatz von Protamin in der Verdünnung von 1:50 zum Inkubationsgemisch unter diesen Versuchsbedingungen keine zusätzlichen Trübungen verursacht.

Die Vorteile dieser Versuchsanordnung für die Bestimmung von IgA im Liquor sind:

1. die erhöhte Empfindlichkeit der Methode (0,3 mg IgA/l). Allerdings kann eine ähnlich gute Empfindlichkeit durch eine Langzeitinkubation (z.B. 18 Stunden) erreicht werden (0,5 mg IgA/l).
2. die Einsparung von Antiserum.

Es ist nicht notwendig, einen ähnlichen Ansatz für die Bestimmung von IgG einzusetzen, da die bisher übliche Methode (29) für die Bestimmung ausreicht.

Das Bestimmungsverfahren für IgM im Liquor unter Zusatz von Protamin hat eine untere Meßgrenze von 0,8 mg IgM/l. Im Vergleich zu der von SCHLIEP et al. (38) erwähnten Methode mit der gleichen Empfindlichkeitsgrenze kann man durch Protaminzusatz drei Viertel des Antiserums einsparen. Nicht alle Liquores haben einen ausreichend hohen IgM-Gehalt, um einen Nachweiß von IgM mit dieser Methode zu führen.

2.7.2. Der Äquivalenzpunkt auf der LN Immuntrübungskurve

2.7.2.1. Die Abhängigkeit seiner Lage von verschiedenen Faktoren

Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper läßt sich als Laser-nephelometrische Immunpräzipitationskurve darstellen (s. Abb.4). Der Äquivalenzpunkt, das Maximum dieser Kurve, kann bei den LN Assays für die Immunglobuline IgG, IgA und IgM und für Albumin einer bestimmten Antigenkonzentration zugeordnet werden, da die Kurven auf beiden Seiten des Äquivalenzpunktes steil abfallen: Dies ist u.a. für IgA in Abbildung 4, für IgM in Abbildung 10 und für Albumin in Abbildung 13 dargestellt.

Die Lage des Aquivalenzpunktes auf der Immuntrübungskurve ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

- der Antigenmenge (Abb.16)
- der Antikörpermenge (Abb.11)
- der Inkubationszeit (Abb.6)

und falls vorhanden von

- kreuzreagierenden Antigenen (Abb.12)
- kreuzreagierenden Antikörpern

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Protamin (Abb.9) und Patentblau (Abb.14), falls sie dem Inkubationsgemisch zugesetzt werden, den Äquivalenzpunkt verschieben können. Es handelt sich jedoch nicht um einen einheitlichen Mechanismus, der zu diesen Verschiebungen führt:

Der Einfluß der immunologischen Reaktanden, spezifischer und unspezifischer Antigene und Antikörper, kann durch immunologische Mechanismen erklärt werden. Darauf komme ich später noch zurück.

Die Inkubationszeit spielt nur bei kürzeren Inkubationszeiten eine Rolle. Bei einer achtzehnstündigen Inkubation, d.h. wenn sich bei den kleinen Antigen- bzw. Antikörperkonzentrationen ebenfalls ein Gleichgewicht eingestellt hat, tritt ihr Einfluß völlig zurück. Ein gutes Bespiel dafür ist der Versuch mit dem kreuzreagierenden bovinen Albumin, bei dem sich erst nach einer Langzeitinkubation die Äquivalenzpunktverschiebung der kleinen Antiserumkonzentration der der großen angeglichen hat (Vgl. Abb.12 mit Abb.13).

Der Einfluß von Protamin und Patentblau unterscheidet sich nicht nur dadurch, daß der Zusatz von Protamin den Äquivalenzpunkt in den Bereich größerer Antigenkonzentrationen, und der von Patentblau ihn in die Zone kleinerer Antigenkonzentrationen verschiebt: Man verdünnt die Küvetten beider Ansätze noch einmal mit physiologischer Kochsalzlösung und mißt die Trübung erneut. Dabei bleibt die Aquivalenzpunktverschiebung zwischen den Ansätzen mit und ohne Protamin bestehen, während der Unterschied zwischen den Äquivalenzpunkten der Kurven mit und ohne Patentblau verschwindet. Für eine "echte" Äquivalenzpunktverschiebung, wie sie sich z.B. durch Zusatz von mehr Antikörpern zum Inkubationsgemisch ergibt, ist typisch, daß die

maximale Trübung noch in derselben Küvette wie zuvor gemessen werden kann, wenn man den Inhalt aller Küvetten des entsprechenden Ansatzes verdünnt hat. Genauso ist es bei dem Zusatz von Protamin, während es bei dem Zusatz von Patentblau zu einer anderen Art von Äquivalenzpunktverschiebung kommt, die ich als "Pseudoäquivalenzpunktverschiebung" bezeichnen möchte.

2.7.2.2. Bestimmung von unbekannten Antikörperkonzentrationen mittels Äquivalenzpunktbestimmung

Im vorigen Kapitel wurden die möglichen Ursachen für eine Verschiebung des Äquivalenzpunktes genannt. Eine davon ist die Änderung des Antikörpergehaltes im Ansatz. Damit wollen wir uns nun näher beschäftigen:

In Abbildung 5 ist die Verschiebung des Äquivalenzpunktes bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen dargestellt. Dabei läßt sich der Äquivalenzpunkt einer bestimmten Antikörperkonzentration genau einer bestimmten Antigenmenge zuordnen. Bei Halbierung der Antikörperkonzentration verschiebt sich der Äquivalenzpunkt genau auf die Hälfte der Antigenkonzentration usw..

Das angeführte IgA-Anti-IgA-System hat einige Vorteile, die es ermöglichen, schon mit wenigen Standard-Serum-Verdünnungen die Lage des Äquivalenzpunktes einer Antikörperkonzentration zu ermitteln, wenn man eine weitere Immuntrübungskurve zum Vergleich hat:

Inkubiert man genügend lange, d.h. mindestens 18 Stunden, so sind die beiden Schenkel der Immuntrübungskurve in etwa gerade, und die entsprechenden Schenkel verschiedener Immuntrübungskurven, d.h. z.B. die Antigenüberschuß-Bereiche, parallel zueinander, wenn es sich um verschiedene Konzentrationen des gleichen Antiserums handelt.

Es ist allerdings notwendig, daß man bei der Bestimmung die Standard-Serum-Verdünnungen so wählt, daß sie z.T. im Antigen- und z.T. im Antikörperüberschuß-Bereich liegen. Denn nur so erhält man Punkte, die z.T. auf dem aufsteigenden und z.T. auf dem absteigenden Schenkel der Immuntrübungskurve liegen, und kann dadurch den Äquivalenzpunkt extrapolieren.

Zur Bestimmung einer unbekannten Antikörperkonzentration geht man folgendermaßen vor: Man bestimmt ein Vergleichsantiserum

mit einem bekannten Antikörpertiter und die Serum-Probe mit dem unbekannten Titer. Dabei ist es wichtig, daß der Inhalt der Küvetten nach achtzehnstündiger Inkubation fünf Minuten vor der Messung aufgeschüttelt wird, um so die störenden Sedimentationseffekte auszuschalten. Kennt man nun die Antigenkonzentration der einzelnen Äquivalenzpunkte, so läßt sich aus ihnen die unbekannte Antikörperkonzentration berechnen:

$$Ak_{unbek.} = \frac{Ag_{unbek.}}{Ag_{bek.}} \times Ak_{bek.}$$

Wobei $Ak_{bek.}$ die bekannte Antikörperkonzentration der Vergleichskurve, $Ag_{bek.}$ die Antigenkonzentration am Äquivalenzpunkt der Vergleichskurve, $Ag_{unbek.}$ die Antigenkonzentration am Äquivalenzpunkt der Kurve der Probe mit dem unbekannten Titer und $Ak_{unbek.}$ die unbekannte Antikörperkonzentration ist.

Um zu zeigen, daß diese Methode nicht nur im IgA-Anti-IgA-System anwendbar ist, machten wir einen ähnlichen Versuch mit dem IgM-Anti-IgM-System. Hier simulierten wir Seren mit unterschiedlichen Antikörpertitern, indem wir das Serum nicht nur mit physiologischer Kochsalzlösung, sondern auch mit Kaninchen-Serum ohne Antikörper gegen humanes IgM verdünnten. Es ließ sich zeigen, daß auch hier das für das IgA-Anti-IgA-System Gesagte gilt.

Zu der Vorgehensweise ist jedoch zu sagen, daß sie nur in solchen Versuchssystemen anwendbar ist, wo andere, nicht spezifische Verschiebungen des Äquivalenzpunktes ausgeschlossen werden können. Dies muß im Einzelfall geprüft werden. Die beiden angeführten Beispiele haben nur Modellcharakter, um auf diese bisher nicht angewendete Weise der Laser-nephelometrischen Bestimmung von Antikörpern hinzuweisen.

Wir versuchten, mittels dieser Methode Antikörper gegen Insulin nachzuweisen, was aber nicht gelang, denn in diesem System ist das Antigen zu klein: Insulin ist mit einem Molekulargewicht von circa 6000 erheblich kleiner als Albumin (Molekulargewicht = 69000) oder gar IgA. Es ist zwar möglich, durch den Zusatz von Protamin und Zink bzw. Aminochinurid (Surfen) die Insulinmoleküle Laser-nephelometrisch als Komplexe sichtbar zu machen; jedoch stört und überlagert dieser Prozeß nun seinerseits die Antigen-Antikörper-Reaktion, so daß wir keinen Äquivalenzpunkt

finden konnten. Vielleicht spielte auch die geringe Menge an spezifischen Antikörpern dabei eine wichtige Rolle.

Mit diesem Beispiel möchte ich nur darauf hinweisen, daß die Laser-Nephelometrie mit dem Helium-Neon-Laser und seiner Wellenlänge von 633 nm gewisse Grenzen hat, was die Größe des Antigens angeht.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Anwendung dieser Vorgehensweise ist die genaue Abgrenzbarkeit des Äquivalenzpunktes, was in dem obigen Beispiel nicht möglich ist. Diese Abgrenzung des Äquivalenzpunktes ist zwar auch im trüben Medium möglich (s. S.33), aber eine stärkere Trübung kann die Ermittlung des Äquivalenzpunktes erschweren. Daher ist es besser, die Antiseren vor der Bestimmung der Antikörperkonzentration zu reinigen und / oder zu verdünnen.

2.7.2.3. Der Einfluß von Kreuzreaktionen

Setzt man dem Inkubationsgemisch kreuzreagierende Substanzen zu, so kommt es zu einer Verschiebung der Immuntrübungskurve und damit auch des Äquivalenzpunktes. In den Abbildungen 12 und 13 ist dies für ein Albumin-Anti-Albumin-System dargestellt: Die kreuzreagierenden Antigene (im Beispiel: das bovine Albumin) "stehlen" den vorgegebenen Antigenen (dem humanen Albumin) einen Teil ihrer Antikörper, so daß für ein optimales Verhältnis zwischen Antikörpern und Antigenen, das am Äquivalenzpunkt vorliegt, weniger spezifische Antigene notwendig sind. Das Trübungsmaximum stellt sich also schon bei einer niedrigeren Antigenkonzentration ein. Das hat je nachdem, mit welchem Teil des Inkubationsgemisches es in den Ansatz gebracht wurde, verschiedene Folgen:

Wird der Ansatz zur Bestimmung von z.B. IgA im Liquor in der herkömmlichen Weise verwendet, so kommt es

1. zu falsch hohen Ergebnissen, wenn das kreuzreagierende Antigen im Standard-Serum enthalten ist, das zur Erstellung der Eichkurve verwendet wird.
2. zu falsch niedrigen Ergebnissen, wenn das kreuzreagierende Antigen im Liquor, dessen IgA-Gehalt bestimmt werden soll, enthalten ist.
3. eventuell zu richtigen Ergebnissen, wenn das kreuzreagieren-

de Antigen mit dem Antiserum eingeführt wurde, da dieses sowohl für die Eichkurve als auch für die Proben eingesetzt wird. Allerdings verliert man durch die Verschiebung des Äquivalenzpunktes in die Zone niedrigerer Antigenkonzentrationen die Möglichkeit zur Bestimmung von im Verschiebungsbereich liegenden höheren Antigenkonzentrationen. Auch im Bereich der niedrigen Antigenkonzentrationen kann man v.a. bei einer kurzen Inkubationszeit (eine bis drei Stunden je nach Methode) an Empfindlichkeit verlieren, da sich hier die Werte infolge der relativ hohen Konzentration an störendem Antigen kaum noch von denen ohne Zusatz von spezifischem Antigen unterscheiden.

Daß dies auch einmal ungewollt vorkommen kann, ist an unserem Versuch mit dem IgA-Anti-IgA-System, dem wir IgG in zehnmal so hoher Konzentration, wie es sonst im Standardserum vorhanden ist, zusetzten, zu erkennen. Diese bei Immunkrankheiten durchaus im Bereich des Möglichen liegende IgG-Konzentration führt zu einem falsch niedrigen Ergebnis bei der IgA-Bestimmung. Die Höhe des Fehlers ist von dem IgA-Gehalt der Probe abhängig.

Benutzt man eine Methode, die auf der Basis von Äquivalenzpunkt-Verschiebungen den Antigen- bzw. Antikörpergehalt von Lösungen bestimmt, so kommt es ebenfalls zu Fehlern durch kreuzreagierende Substanzen. Hier kann man an der Veränderung der Immuntrübungskurve erkennen, ob z.B. ein kreuzreagierendes Antigen mit dem Standard-Serum oder mit dem Antiserum in das System eingeführt wurde, wenn man den Kurvenverlauf ohne störendes, kreuzreagierendes Antigen kennt:

1. Wurde es mit dem Standard-Serum eingeführt, so wird das kreuzreagierende Antigen mitverdünnt, und das Verhältnis zwischen kreuzreagierendem und spezifischem Antigen bleibt gleich. Es wird sich also nur eine Parallelverschiebung der Kurve ergeben (Abb.12).
2. Wurde das unspezifische Antigen aber mit dem Antiserum eingeführt, so kommt es zu einem ganz anderen Verlauf der Kurve, da sich das Verhältnis zwischen unspezifischem und spezifischem Antigen immer mehr zu Ungunsten des Letzteren verschiebt, je weiter man in den Bereich der kleinen Antigenkonzentrationen geht. Hier läuft die Kurve verfrüht aus.

Mittels der Methode der Äquivalenzpunktbestimmung lassen sich

aufgrund der Verschiebung der Äquivalenzpunkte durch kreuzreagierende Substanzen Aussagen über die Stärke der Kreuzreaktion machen:

Kennt man die Menge der im Inkubationsgemisch vorhandenen spezifischen Antigene und Antikörper, so kann man den zu erwartenden Äquivalenzpunkt, der sich ohne kreuzreagierende Substanzen ergibt, bestimmen. Hat man ebenfalls den Äquivalenzpunkt des Ansatzes, in dem auch die kreureagierende Substanz vorhanden ist, bestimmt, so ergibt sich die Äquivalenzpunktverschiebung aus dem Abstanz der Äquivalenzpunkte mit und ohne kreuzreagierendem Antigen. Daraus kann man die Menge an spezifischem Antigen bestimmen, die durch das kreuzreagierende, unspezifische Antigen verdrängt wird.

2.7.3. Die Messung im trüben Medium

2.7.3.1. Einfluß Streulicht-verstärkender und Streulicht-vermindernder Substanzen

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie Substanzen die Lichtintensität an der Photodiode verändern können: Absorption und Streuung. Bei der Nephelometrie wird, wie bereits erwähnt, die Streulichtintensität des Laserlichts gemessen. Bei einer sehr hohen Konzentration, auch von beugenden Substanzen, kommt es zu einer Abnahme des Voltausschlags. Man kann dies daran erkennen, daß eine Verdünnung der Probe zu einem erhöhten Voltausschlag führt. In vielen Fällen ist dies schon mit dem bloßen Auge zu erkennen:

Vermutet man, daß eine Probe einen zu niedrigen Ausschlag zeigt, so vergleicht man sie mit einer zweiten Probe, indem man beide gegen eine Lichtquelle hält und die Trübung vergleicht. Die zweite Probe muß so gewählt werden, daß ihr Ausschlag größer oder mindestens gleich dem falsch zu niedrigen Ausschlag der ersten Probe ist, aber kleiner oder gleich dem zu erwartenden richtigen Ausschlag der ersten Probe. Ergebnisse, die falsch zu niedrig gemessen wurden, gab es immer wieder bei unseren Versuchen.

An der Art der Veränderungen der Immuntrübungskurve kann man unterscheiden, ob die störenden Substanzen mit der Antigen-Verdünnung (d.h. z.B. im Standard-Serum oder in der Patienten-

serumprobe) oder mit der Antikörper-Verdünnung (z.B. im Antiserum) in das System gebracht wurden. Anhand des hier als Modell benutzten IgA-Anti-IgA-System läßt sich folgendes zeigen:

1. Die Streulicht-verstärkende Substanz wird im Antiserum eingeführt.
   Bei dem in Abbildung 14 dargestellten System wird die Antigenkonzentration in den Testküvetten variiert, und die Antikörperkonzentration konstant gehalten. Enthält nun das Antiserum eine Streulicht-verstärkende Substanz, so wird durch die Vorverdünnung (im Beispiel 1:10) diese zwar mitverdünnt, jedoch ist die Konzentration an störender, Streulicht-verstärkender Substanz in allen Küvetten gleich. Dies führt dazu, daß die LN Immuntrübungskurve im Bereich der kleinen Antigenkonzentrationen abgeflacht und generell mit einem erhöhten Voltausschlag verläuft.
2. Die Streulicht-verstärkende Substanz wird im Antigen-Standard eingeführt.
   Da die Streulicht-verstärkende Substanz entsprechend der Antigenkonzentration mitverdünnt wird, ist in Küvetten mit kleinen Antigenmengen auch nur wenig Streulicht-verstärkende Substanz vorhanden. Das Ergebnis wird hier kaum verändert, während bei hohen Antigenkonzentrationen und damit hohen Konzentrationen an Streulicht-verstärkender Substanz der Ausschlag erhöht ist.
3. Eine Streulicht-vermindernde Substanz wird im Antiserum eingeführt.
   Der Abfall der Kurve ist über die ganze Skala der Antigenkonzentrationen in unserem Beispiel mit Patentblau in etwa gleich stark.
4. Eine Streulicht-vermindernde Substanz wird im Antigen-Standard eingeführt.
   Da hier, ähnlich wie bei 2., die Konzentration der Streulicht-vermindernden Substanz entsprechend der Antigenkonzentration mitverdünnt wird, ist der Ausschlag bei den Küvetten mit kleinen Antigenkonzentrationen kaum verändert. Bei der im Beispiel gewählten Streulicht-vermindernden Substanz, Patentblau, kann es bei entsprechender Konzentration zur Nivellierung und "Pseudoverschiebung" des Äquivalenz-

punktes kommen. Diese Pseudoverschiebung ist von einer "echten" Verschiebung des Äquivalenzpunktes durch spezifische Antigene, spezifische Antikörper oder kreuzreagierende Substanzen dadurch zu unterscheiden, daß man eine Verdünnung des Ansatzes mit physiologischer Kochsalzlösung durchführt (S.38).

Wendet man eine Methode an, die mit einer Äquivalenzpunktbestimmung im trüben Medium arbeitet, so muß man bei deren Erarbeitung darauf achten, daß hierbei möglichst keine "Pseudoäquivalenzpunktverschiebung", wie unter 4. erwähnt wurde, auftritt. Man müßte in diesem Fall durch entsprechende Vorverdünnung versuchen, diesen Effekt soweit aufzuheben, daß keine "Pseudoäquivalenzpunktverschiebung" mehr auftritt.

Noch problematischer ist eine "echte" Äquivalenzpunktverschiebung durch Streulicht-verstärkende Substanzen, wie sie z.B. auftritt, wenn man dem Ansatz Protamin zufügt.

Es sei noch kurz erwähnt, daß die Substanzen Protamin und Patentblau in menschlichen Körperflüssigkeiten eigentlich nicht vorkommen. Die Substanzen wurde hier nur zu Modellzwecken verwendet.

2.7.3.2. Möglichkeiten bei trüben Medien

Wie bereits vorne erläutert, wird die Laser-nephelometrische Meßmethode normalerweise nur in klaren Medien, wie z.B. Liquor, angewendet. Da hier der absolute Wert der Trübung anhand einer Eichkurve zur Berechnung z.B. des Gehalts an Immunglobulinen herangezogen wird, führt jede unspezifische Verstärkung der Trübung zu einer fehlerhaften Erhöhung, seltener Erniedrigung, des Wertes. Dies ist z.B. bei lipämischen Seren durch die Lipide und Lipoproteine der Fall.

Man kann aber nicht einfach die Streulichtintensität von z.B. trüben Patientenseren ohne Antikörperzusatz messen und vom Streulicht-Signal der Antigen-Antikörper-Resktion abziehen, da zwischen den beiden Meßgrößen kein additiver Zusammenhang besteht, wie sich in unseren Experimenten zeigte, und wie es bereits von SIEBER (36) beschrieben wurde.

Man kann also nur Flüssigkeiten verwenden, die bereits eine vernachlässigbare Hintergrundtrübung haben bzw. bei denen die-

se durch Filtrieren (35, 36, 37), Behandeln mit Frigen (37, 38) oder Zentrifugieren (38) erreicht wurde.

Bei unseren Versuchen war eine vorherige Behandlung der Antiseren gegen die Immunglobuline und Albumin, wie es von anderen Autoren beschrieben ist (z.B. 38), nicht notwendig. Ähnliches hatten bereits PFLUGHAUPT et al. (29) berichtet. Jedoch war es u.a. bei lipämischen Insulin-Antikörperseren von Diabetikern notwendig, diese zu reinigen. Z.T. wurden diese sowohl durch Millipore-Filter gepreßt, als auch mit Frigen behandelt, wodurch eine Reinigung selbst stark lipämischer Seren möglich war.

Eine weitere bei nephelometrischen Bestimmungen angewendete Methode ist das Verdünnen mit einem klaren Medium, um so eine vernachlässigbare Hintergrundtrübung zu erzielen. So können z.B. KILLINGSWORTH et al. sogar auf eine Reinigung von lipämischen Patientenseren bei ihrer Methode für IgG, IgA und IgM im Serum verzichten, da diese sehr stark verdünnt werden (19). Dies geht aber nur, wenn genügend Antigene bzw. Antikörper im zu verdünnenden Medium vorhanden sind. Eine Bestimmung von IgA in Mammzystenflüssigkeit wäre so nicht möglich. Im folgenden Teil dieser Arbeit wird eine Methode beschrieben, wie man Antigenkonzentrationen im trüben Medium bestimmen kann.

Bleibt die Antigen-Antikörper-Reaktion unbeeinflußt, und tritt keine Pseudoäquivalenzpunktverschiebung, wie z.B. bei Patentblau, auf, so führen sowohl Streulicht-verstärkende als auch -abschwächende Substanzen-- auch bei hoher Konzentration - nicht zu einer Verschiebung des Äquivalenzpunktes. Benutzt man die Äquivalenzpunktbestimmung zur Bestimmung einer unbekannten Antigenkonzentration mit einer Antiserum-Verdünnungsreihe, so ist man von der unspezifischen Trübung unabhängig.

Gegenüber den bisher beschriebenen Versuchen wurde statt einer Antigen-Verdünnungsreihe eine Antikörper-Verdünnungsreihe eingesetzt. Daraus ergibt sich - auch für die graphische Darstellung-- ein anderes Bild: Bei den bisherigen Abbildungen wurde die Antigenkonzentration gegen den Voltausschlag aufgetragen, nun wird die Antikörperkonzentration gegen den Voltausschlag aufgetragen. In Abbildung 15 stellt die durchgezogene Linie diese neue Auftragsweise dar. Eine der schraffiert

gezeichneten Linien ist eine Vergleichskurve mit dem gleichen Äquivalenzpunkt. Bei der letzteren wurde allerdings wie bisher die Antigenkonzentration variiert.

Bei der neuen Auftragsweise befindet sich, im Gegensatz zur bisherigen, der Antikörperüberschuß als Plateau rechts vom Äquivalenzpunkt, und der Antigenüberschuß links davon. Der Übergang vom Äquivalenzpunkt zum Antigenüberschuß wird durch einen steilen, abrupten Abfall gekennzeichnet.

Der Vorteil dieser Versuchsanordnung ist, daß man so die Antigenkonzentration mittels Äquivalenzpunktbestimmung ermitteln kann. Mit der anderen Versuchsanordnung ist die Antikörperkonzentration bestimmbar.

Bestimmt man die Äquivalenzpunkte verschiedener Antigenkonzentrationen mit einer Antikörperverdünnungsreihe, so verschieben sich die Kurven bei Verwendung des gleichen Antikörperserums parallel, wenn sich die Hintergrundtrübungen der verschiedenen Medien, die das Antigen enthalten , nicht zu sehr unterscheiden. Wenn die Kurven parallel sind, kann man mit wenigen Antikörperverdünnungen den Äquivalenzpunkt extrapolieren. (Abb.16)

Als Beispiel für eine mögliche Anwendung dieser Methode wurde der Gehalt an IgA von Mammzysteninhalt bestimmt (Abb.17).

Die Versuchsbedingungen sind den entsprechenden Anwendungsmöglichkeiten anzupassen. Bei kleinen Antigenkonzentrationen sind längere Inkubationszeiten nötig, da die Antigen-Antikörper-Reaktion verzögert abläuft. Aber, je kleiner die vorgegebene Standardkonzentration ist, um so größer ist die Empfindlichkeit der Methode.

Alle Methoden, die auf einer Äquivalenzpunktbestimmung beruhen, sind arbeitsaufwendiger als die herkömmlichen Methoden und daher nur dort anzuwenden, wo mit den herkömmlichen keine guten Ergebnisse erzielt werden können.

Es ist für eine solche Methode sehr nützlich, ein entsprechendes Computerprogramm zu erstellen, mit dem man sich die sehr aufwendige graphische Auswertung erspart.

3. ZUSAMMENFASSUNG

- Es wurde kurz die historische Entwicklung der Nephelometrie dargestellt und die Begriffe Nephelometrie und Laser erläutert.
- Die Laser-nephelometrische Bestimmung von IgA im Liquor wird durch Zusatz von Protamin verbessert. Sie zeigt eine gute Korrelation mit der Methode ohne Protaminzusatz: Bei 30 untersuchten Proben ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,9875. Die Vorteile dieser wirtschaftlicheren Methode liegen in einer verbesserten Empfindlichkeit (IgA-Konzentrationen bis 0,3 mg/l sind meßbar) und einem geringeren Verbrauch an Antiserum.
- Auch die Laser-nephelometrische Bestimmung von IgM im Liquor wird bei Zusatz von Protamin wirtschaftlicher, da der Antiserumverbrauch gesenkt werden kann. Die untere Meßgrenze liegt dabei bei 0,8 mg IgM/l.
- Die Lage des Äquivalenzpunktes der Laser-nephelometrischen Immuntrübungskurve ist von verschiedenen Faktoren abhängig:
  - der Antigen- und Antikörpermenge
  - der Inkubationszeit
  - dem Gehalt an kreuzreagierenden Antigenen und Antikörpern.

  Dies wurde anhand von Modellversuchen in einem IgA-Anti-IgA-System, z.T. auch im IgM-Anti-IgM-System und im Albumin-Antialbumin-System, gezeigt. Ferner ließ sich das Trübungsmaximum in jenem System durch Protamin-Zusatz verschieben.
  Bei Zusatz von Streulicht-verstärkenden (Detritus) bzw. -abschwächenden Substanzen (Patentblau) kam es zu keiner echten Verschiebung des Äquivalenzpunktes, aber zu erheblichen Verzerrungen der Immuntrübungskurve.
- Mittels der Bestimmung von Äquivalenzpunkten bzw. ihrer Verschiebung untereinander konnten wir im IgA-Anti-IgA-System als Modell, z.T. wurden auch das IgM-Anti-IgM-System und das Albumin-Antialbumin-System verwendet, folgende neue Möglichkeiten aufzeigen:

- die Laser-nephelometrische Bestimmung von Kreuzreaktionen
- die Bestimmung von unbekannten Antikörperkonzentrationen im klaren Medium
- die Bestimmung von unbekannten Antigenkonzentrationen im trüben Medium
  Letzteres wurde am Beispiel einer Bestimmung von IgA in Mammazystenpunktat erläutert.

- Zur Resuspension der ausgefallenen Komplexe bei Langzeitinkubationen entwickelten wir, um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, eine Methode, die auf dem Einsatz eines Rotormixers basiert.

4. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALPER, C.A.: Automated nephelometric determination of serum haptoglobin, C'3 and alpha-1-antitrypsin

Advan. Automat. Anal. Technicon International Congress 1970, 1, E.C. Barton et al., Eds. Thurman Assoc., Miami Fla. 33132, 1971, p.13

2. ANDO, T., YAMASAKI, M., SUZUKI, K.: Protamines

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1973)

3. BOYDEN, A., BOLTON, E., GERMEROY, D.: Precipitin testing with special reference to the photoelectric measurement of turbidity

J. Immunol. 57, 211 (1947)

4. BUFFONE, G.J., SAVORY, J., CROSS, R.E.: Use of a laser-equipped centrifugal analyzer for kinetic measurement of serum IgG

Clin. Chem. 20, 1320 (1974)

5. BUFFONE, G.J., SAVORY, J., HAMMOND, J.E.: Evaluation of kinetic light scattering as an approach to the management of specific proteins with the centrifugal analyzer. I. Methology

Clin. Chem. 21, 1731 (1975)

6. BUFFONE, G.J., SAVORY, J., HERMANS, J.E.: Evaluation of kinetic light scattering as an approach to the management of specific proteins with the centrifugal analyzer. II. Theoretical considerations

Clin. Chem. 21, 1735 (1975)

7. CONRAD, A., SCHÜRMANN, J., KREUTZ, F.H., SIEBER, A.: Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Proteinbestimmung mit Hilfe eines Laser-Nephelometers im Routinelabor

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 299 (1978)

8. CHOW, B.F.: The determination of plasma or serum albumin by means of a precipitin reaction

J. Biol. Chem. 167, 757 (1947)

9. DEATON, C.D., MAXWELL, K.W., SMITH, R.S., CREVELING, R.L.: Use of laser nephelometry in the measurement of serum proteins

Clin. Chem. 22, 1465 (1976)

10. DEBYE, P.: Light scattering in solutions

J. Appl. Phys. 15, 338 (1944)

11. ECKMAN, I., ROBBINS, J.B., VAN DEN HAMER, C.J.A., LENTZ, J., SCHEINBERG, I.H.: Automation of a quantitative immunochemical microanalysis of human serum transferrin: A model system
Clin. Chem. 16, 558 (1970)

12. GITLIN, D., EDELHOCH, H.: A study of the reaction between human serum albumin and its homologous equine antibody through the medium of light scattering
J. Immunol. 66, 67 (1951)

13. GOODMAN, M., RAMSEY, S.R., SIMPSON, W.L., REMP, D.G., BASINSKI, D.H., BRENNAN, M.J.: The use of chicken antiserum for the rapid determination of plasma protein components. I. The assay of human serum albumin and gamma globulin
J. Lab. Clin. Med. 49, 151 (1957)

14. HAGEDORN, H.C., JENSEN, B.N., KRARUP, N.B., WOODSTRUP, I.: Protamine Insulinate
Jour. A. M. A. 106, 177 (1936)

15. HOBLER, H., PFLUGHAUPT, K.-W. Protamine optimised laser-nephelometric measurement of IgA in cerebrospinal fluid (CSF)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, (1979)

16. JUKES, T.H., SCHMIDT, C.L.A.: The combination of certain fatty acids with lysine, argine, and salmine
J. biol. Chem. 110, 9 (1935)

17. KABAT, E.A., GLUSMAN, M., KNAUB, V.: Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods
Amer. J. Med. 4, 653 (1948)

18. KILLINGSWORTH, L.M., SAVORY, J., TEAGUE, P.O.: Automated immunoprecipitin technique for the analysis of the third component of complement (C'3) in human serum
Clin. Chem. 17, 374 (1971)

19. KILLINGSWORTH, L.M., SAVORY, J.: Automated immunochemical procedures for the measurement of immunglobulins IgG, IgA, and IgM in human serum
Clin. Chem. 17, 936 (1971)

20. KILLINGSWORTH, L.M., SAVORY, J.: Manual nephelometric methods for immunochemical determination of immunoglobulins IgG, IgA, and IgM in human serum
Clin. Chem. 18, 335 (1972)

21.KILLINGSWORTH, L.M., SAVORY, J.: Nephelometric studies of the precipitin reaction: A model system for specific protein measurements

Clin. Chem. 19, 403 (1973)

22.KOSSEL, A.: Über die basischen Stoffe des Zellkerns

Z. physiol. Chem. 22, 176 (1896)

23.LARSON, C., ORENSTEIN, P., RITCHIE, R.F.: An automated method for quantitation of proteins in body fluids

Advan. Automat. Anal. Technicon International Congress 1970, 1, E.C. Barton et al., Eds. Thurman Assoc., Miami, Fla. 33132, 1971, p.9

24.LIBBY, R.L.: The photoreflectometer - an instrument for the measurement of turbid systems

J. Immunol. 34, 71 (1938)

25.LIBBY, R.L.: A new and rapid quantitative technic for the determination of the potency of types I and II antipneumococcal serum

J. Immunol. 34, 269 (1938)

26.LIZANA, J., HELLSING, K.: Manual immunonephelometric assay of proteins, with use of polymer enhancement

Clin. Chem. 20, 1181 (1974)

27.MARKOWITZ, H., TSCHIDA, A.R.: Automated quantitative immunochemical analysis of human immunoglobulins

Clin. Chem. 18, 1364 (1972)

28.PAZYLECKI, Sr. J., Untersuchungen über Polysaccharoproteine X. Mitteilung: Rolle der einzelnen Aminosäurenreste und Schlußbetrachtungen

Biochem. Z. 286, 360 (1936)

29.PFLUGHAUPT, K.-W., SIEBER, A., HACKENBERG, S.: IgG-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis mittels Laser-Nephelometer

Laboratoriumsblätter 28, 37 (1978)

30.PFLUGHAUPT, K.-W. HOBLER, H., SCHMITT, J.: Anwendung der Laserlicht-Nephelometrie (LN) in der Liquordiagnostik: LN-Immunoassay in trüben Medien

Fortschritte der technischen Medizin in der neurologischen Diagnostik und Therapie, Wien 1979, H. Reisner und G. Schnaberth

31. RITCHIE, R.F.: A simple, direct, and sensitive technique for the measurement of specific protein in dilute solution

J. Lab. Clin. Med. 70, 512 (1967)

32.ROWE, D.S., ANDERSON, S.G., GRAB, B.: A research standard for human serum IgG, IgA, and IgM

Bull. W.H.O. 42, 535 (1970)

33.SAVORY, J., HEINTGES, M.G., KILLINGSWORTH, L., POTTER, J.M.: Manual and automated determination of immunoglobulins in unconcentrated cerebrospinal fluid

Clin. Chem. 20, 1071 (1972)

34.SAVORY, J., BUFFONE, G., REICH, R.: Kinetics of the IgG-anti-IgG reaction, as evaluated by conventional and stopped-flow nephelometry

Clin. Chem. 20, 1071 (1974)

35.SIEBER, A., GROSS, J.: Determination of proteins by laser nephelometry

Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq. 23, 295 (1975)

36.SIEBER, A., GROSS, J.: Proteinbestimmung durch Laser-Nephelometrie

Laboratoriumsblätter 26, 117 (1976)

37.SIEBER, A.: Plasmaprotein-Bestimmung durch Laser-Nephelometrie: Laborpraxis

Laboratoriumsblätter 27, 109 (1977)

38.SCHLIEP, G., FELGENHAUER, K.: Rapid determination of proteins in serum and cerebrospinal fluid by laser-nephelometry

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 631 (1978)

39.SCHULTZE, H.E., SCHWICK, G.: Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen

Clin. Chim. Acta 4, 15 (1959)

40.SKRZYDLEWSKI, Z., WOROWSKI, K.: Low density lipoproteins (LDL) complexes with protamines

Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol.) 24, 201 (1976)

41.WARBURG, O., CHRISTIAN, W.: Isolierung und Kristallisation des Proteins des oxydierenden Gärungsfermentes

Biochem. Z. 303, 40 (1939)

42.WEGFAHRT, P.F., FISH, M.B., ALDANA, S.B.: Automated immunoprecipitin determination of albumin in serum

Advan. Automat. Anal. Technicon International Congress 1970, 1, E.C. Barton et al., Eds. Thurman Assoc., Miami, Fla. 33132, 1971, p.21

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Korrektur der Arbeit möchte ich Herrn Dr. rer. nat. K.-W. Pflughaupt danken. Für seine große Hilfe bei den Versuchen möchte ich Herrn Dr. med. H. Hobler danken. Für die vielen kleinen Tips und Hilfestellungen, die für mich sehr wertvoll waren, danke ich ferner Frau Preis.

LEBENSLAUF

Am 26.9.1955 wurde ich als erstes von 4 Kindern von Walter und Kläre Schmitt, geborene Müller, beide kaufmännische Angestellte, in Bamberg geboren.

Im September 1962 trat ich in die Volksschule St.Gangolf in Bamberg ein, von der ich im September 1966 auf das Dientzenhofer-Gymnasium in Bamberg wechselte. Die letzten beiden Schuljahre verbrachte ich am Kaiser-Heinrich-Gymnasium in Bamberg. Dort schloß ich im Juni 1975 mit dem Abitur die Schule ab.

Im Herbst des gleichen Jahres nahm ich mein Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf. Ab dem Sommersemester 1976 kam noch Indologie als zweites Studienfach hinzu. 1982 werde ich mein Medizinstudium abschließen.

Jürgen Schmitt

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80